



Invalidation du gène codant pour la Heat shock protein 27 chez la souris : un modèle pour comprendre le rôle de ce bio-marqueur de la tendreté de la viande bovine

Malek Kammoun

► To cite this version:

Malek Kammoun. Invalidation du gène codant pour la Heat shock protein 27 chez la souris : un modèle pour comprendre le rôle de ce bio-marqueur de la tendreté de la viande bovine. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2013. Français. NNT : 2013CLF22382 . tel-01221208

HAL Id: tel-01221208

<https://theses.hal.science/tel-01221208>

Submitted on 27 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

N° d'ordre : 616

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

- Spécialité Nutrition et Sciences des Aliments -

par

Malek KAMMOUN

Invalidation du gène codant pour la Heat shock protein 27
chez la souris: un modèle pour comprendre
le rôle de ce bio-marqueur de la tendreté de la viande bovine

Jury de thèse

Président :	M. LEBERT André	<i>Professeur à l'Université Blaise Pascal, Clermont-Fd</i>
Rapporteurs :	Mme BLANQUET Véronique	<i>Professeur à la Faculté des Sciences, Limoges</i>
	Mme MOLETTE Caroline	<i>Maître de Conférences INP/ENSAT, Toulouse</i>
Examineurs :	M. TINTIGNAC Lionel	<i>Chargé de Recherches, INRA, Montpellier</i>
	M. OUALI Ahmed	<i>Directeur de Recherches, INRA, Clermont-Fd</i>
Directeurs de thèse :	Mme PICARD Brigitte	<i>Directrice de Recherches, INRA, Clermont-Fd</i>
	Mme CASSAR-MALEK Isabelle	<i>Directrice de Recherches, INRA, Clermont-Fd</i>

Laboratoire d'accueil :

Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores (UMRH)
Equipe Animal Muscle Viande (Amuvi)
63122 Saint-Genès-Champanelle



À la mémoire de mon grand-père,

À mes parents et ma famille,

À tous ceux que j'aime,

Remerciements

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. Que les personnes que j'ai omis de citer veuillent bien m'excuser.

Dans un premier temps, je remercie la région d'Auvergne qui a soutenu mon travail de recherche ainsi que le département phase de l'INRA.

Je tiens à remercier tous les membres du jury, Professeurs, Maître de Conférences et Directeurs de recherches, pour avoir accepté de consacrer une partie de leur temps précieux à la lecture et à l'évaluation de ce travail de thèse :

M. André LEBERT, Président du jury,

Mmes Véronique BLANQUET et Caroline MOLETTE, rapporteurs de ce travail,

Mrs Lionel TINTIGNAC et Ahmed OUALI, examinateurs de ce travail

Ainsi que mes encadrantes de thèse Mmes Brigitte PICARD et Isabelle CASSAR-MALÉK,

J'adresse l'expression de ma très grande reconnaissance et mes sincères remerciements à Mme Brigitte PICARD et à Mme Isabelle CASSAR-MALÉK qui ont assuré la co-direction de ma thèse et sans qui ce projet n'aurait pu être réalisé. Je tiens à les remercier tout particulièrement.

Un grand merci à Brigitte pour sa disponibilité, sa grande patience lors de nos échanges scientifiques et pour m'avoir transmis ses connaissances et son aide très précieuse pour la rédaction de ce travail.

Un grand merci également à Isabelle « ma voisine de bureau » pour sa disponibilité, ses remarques pertinentes, de m'avoir transmis ses connaissances scientifiques et ses conseils judicieux pour la rédaction de ce mémoire. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci pour tes qualités pédagogiques et humaines et pour tous tes encouragements.

Cela a été un grand plaisir de travailler avec vous. Encore merci pour la confiance que vous m'avez accordée, votre gentillesse, votre attention et vos conseils.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à Mme Isabelle VEISSIER, Directrice de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores, pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

Une pensée particulière à Geneviève GENTES, Christiane BARBOIRON et Nicole D'UNOYER, qui m'ont énormément aidé pendant ces années. Merci à elles pour leur humour, leur disponibilité pour leur collaboration technique et également à Arnaud DELAVAUD.

Mes remerciements vont également aux membres de mon comité de thèse composé de Florian GUILLOU, Joëlle HENRY-BERGER et Véronique BLANQUET qui, par leur expertise, leurs idées, remarques et réflexions m'ont beaucoup apporté à la réalisation de ce travail.

Merci Marie-Jo, toujours attentionnée, pour ta bonne humeur, ton écoute, ta gentillesse, et ton aide précieuse chaque fois je te sollicite.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas à l'ensemble des membres de l'équipe Amuvi (Scientifiques et techniciens) pour leur soutien ainsi que pour la très bonne ambiance que j'ai toujours appréciée.

Je tiens également à remercier Thierry ASTRUC de m'avoir encadré pour la réalisation des expériences sur l'ultrastructure musculaire. Merci pour ta disponibilité et tes conseils.

Je tiens à adresser un remerciement spécial à Denise AUBERT du plateau de biologie expérimentale de la souris à Lyon pour nos échanges, à Christophe DELHOMME et à Anne TERRISSE de l'Installation Expérimentale de Nutrition de l'INRA de Theix, à Christelle BLAVIGNAC et Lorraine GAMEIRO du Centre d'Imagerie Cellulaire Santé de la Faculté de médecine. Merci pour votre collaboration.

Merci à Nicolas BARRIERE, Maryse TEYSSEYDRE, et Jean-François BOURDARIAS de l'équipe « Gestion Administrative Mécanique et Editions » de l'Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores pour leur sympathie et aide administrative.

Merci à Roza, une amie très spéciale, avec qui je n'ai partagé que de bons moments !...

Un remerciement spécial à mes amis Moufida et Lahlou. Voilà plus de deux années passées ensemble pendant lesquelles on a vécu des moments formidables ! Des débats sur « tout et rien », de la rigolade et de la bonne humeur !! Merci mes chers associés !

Un grand merci à mes amis de folies : Salem, Khaled, Ahlem, Sinda, Zeina, Khawla, Dorra, Refka, Ramzi, Feriel, Emna, Salim ... Les moments passés ensemble sont inoubliables !...Vous êtes magnifiques !

Un grand merci aussi à tous mes amis et collègues notamment les thésards et stagiaires que j'ai rencontrés pendant ces années si vite passées : Sghaïer, Maya, Marion, Lamia, Wassim, Dali, Marwa, Hajer et Nicolas A... pour votre amitié et sympathie. Je remercie également Gonzalo, José, Amélie, Annabelle, Benoît-Pierre, Nicolas K,

Enfin ces remerciements ne seraient pas complets si je n'avais pas une pensée pour mes proches. Tout d'abord mes parents, Rached et Leïla, qui m'ont toujours soutenu tout au long de mon parcours, ainsi que mes deux frères Anas et Salmene, ma belle-sœur Ines. Merci à vous tous pour votre appui moral indéfectible, votre optimisme, vos encouragements. MILLE MERCI.

Merci à tous !

Sommaire

Sommaire	1
Liste des publications	4
Liste des abréviations	8
Liste des illustrations.....	11
Introduction générale	14
Introduction bibliographique.....	17
Chapitre I : Qualité de la viande bovine.....	18
I.Le muscle squelettique	19
I.1. Structure et fonctions	19
I.2. Ultrastructure	19
I.2.1. Les filaments épais	20
I.2.2. Les filaments fins	21
I.2.3. Myofilaments et contraction musculaire	21
I.3. Propriétés contractiles et métaboliques	22
II.Du muscle à la viande	23
II.1. L'état pantelant	23
II.2. La rigor mortis.....	23
II.3. La maturation	24
III.La tendreté : critère principal d'appréciation de la viande bovine	24
IV.Mesures de la tendreté	26
V.Le déterminisme de la tendreté	26
V.1. Le collagène	27
V.2. Les fibres musculaires	28
V.3. Les lipides	29

V.4. Les systèmes protéolytiques	30
V.5. Apoptose et tendreté de la viande : Une nouvelle hypothèse	33
Chapitre II : Les marqueurs biologiques de la tendreté	36
I. Identification de nouveaux marqueurs biologiques dans la tendreté	37
I.1. Les apports de la génomique.....	37
I.1.1. Protéines de structure	37
I.1.2. Protéines contractiles et métaboliques	38
I.1.3. Protéines du métabolisme du calcium	39
I.1.4. Protéines de stress thermique (Hsps).....	39
I.1.5. Protéines de protection contre le stress oxydant	40
I.2. Intégration des données de génomique.....	41
Chapitre III : Les Protéines de choc thermique (Hsps)	43
I. Des protéines de réponse au stress cellulaire.....	44
II. Familles de Hsps	45
II.1. La famille Hsp90	45
II.2. La famille Hsp70	46
II.3. La famille Hsp40 (Dnaj)	47
II.4. La famille des petites protéines de stress (small Hsps)	48
III. Cas particulier de Hsp27.....	48
III.1. Caractérisation et structure	49
III.2. Fonctions cellulaires.....	49
III.2.1. Rôle de chaperonne moléculaire	49
III.2.2. Inhibition de l'apoptose	50
III.2.3. Protection du cytosquelette.....	50
IV. sHsps et qualité de la viande	51
IV.1. sHsps et dégradation des protéines myofibrillaires au cours de la maturation.....	51

IV.2. sHsps et autres qualités de la viande	53
Objectifs du travail de thèse.....	55
Résultats.....	57
Article I : Kammoun et al. publié dans « European Journal of Histochemistry ».....	58
Article I: A simplified immunohistochemical classification of skeletal muscle fibres in mouse.	59
Article II : Kammoun et al. En correction par les co-auteurs pour soumission à «PLOS ONE».....	65
Article II: The invalidation of HspB1 gene does not impair mouse development but alters the ultrastructural phenotype of muscles.	66
Article III : Kammoun et al. publié dans «Computational and Structural Biotechnology Journal»	86
Article III: A network-based approach for predicting Hsp27 knock-out targets in mouse skeletal muscles.	87
Article IV : Kammoun et al. En préparation pour une soumission à «Journal of proteomics».....	95
Article IV: A proteomic based approach for revealing HspB1 knock-out targets in muscle.	96
Discussion générale.....	112
Conclusions et Perspectives.....	112
Références bibliographiques	124
Résumés	143

Liste des publications

I. Articles scientifiques

- [1] Kammoun M., Cassar-Malek I., Meunier B., Picard B., 2013. A reliable immunohistochemical classification of skeletal muscle fibres in mice. European Journal of Histochemistry. (publié).
- [2] Kammoun M., Picard B., Astruc T., Blanquet V., Cassar-Malek I., 2013. The invalidation of HspB1 gene does not impair mouse development but alters the ultrastructural phenotype of muscles. PLOS ONE. (En correction chez les co-auteurs).
- [3] Kammoun M., Picard B., Henry-Berger J., Cassar-Malek I., 2013. A network-based approach for predicting Hsp27 knock-out targets in mouse skeletal muscles. Computational and Structural Biotechnology Journal. (publié).
- [4] Kammoun M., Cassar-Malek I., Barboiron C., Meunier B., Chambon C., Picard B., 2013. A proteomic based approach for revealing HspB1 knock-out targets in muscle. Journal of proteomics (En préparation).

II. Articles de vulgarisation

- [5] Kammoun M., 2012. Invalidation ciblée d'un gène bio-marqueur de la tendreté de la viande bovine dans le modèle souris. Auvergne Sciences,
<http://www.auvergnesciences.com/magazine-082012-invalidation-d-un-gene-bio-marqueur-de-la-tendrete-de-la-viande-bovine-dans-le-modele-souris.html>.
- [6] Kammoun M., 2013. Utilisation des outils de bio-informatique pour révéler des protéines partenaires de Hsp27. Auvergne Sciences,
<http://www.auvergnesciences.com/magazine-042013-utilisation-des-outils-de-bio-informatique-pour-reveler-des-proteines-partenaires-de-hsp27.html>.

III. Communications dans des congrès et rencontres scientifiques

- [7] Kammoun M., Picard B., Bonnet M., Guillou F., Aubert D., Blanquet V., Henry-Berger J., Astruc T., Cassar-Malek I., 2013. Phénotypage des animaux modèles : L'invalidation du gène HspB1 pour comprendre les mécanismes de tendreté de la viande bovine. Journées d'Animation Scientifique Phase JAS, 03 et 04 octobre 2013, CISP Ravel, Paris. (*Résumé et affiche*).
- [8] Picard B., Gagaoua M., Kammoun M., Terlouw C., Hocquette J.F. Micol D., 2013. Biomarkers of beef tenderness in young bulls of three breeds. 59th International Congress of Meat Science and Technology, August 18th – 23th 2013, Izmir – Turquie. (*Affiche*).
- [9] Kammoun M., Picard B., Henry-Berger J., Cassar-Malek I., 2013. Interactors of Hsp27 protein: A bio-informatic approach. International Conference on Life Science & Biological Engineering, Tokyo 15 - 17 Mars, 2013. (*Résumé et affiche*).
- [10] Kammoun M., Picard B., Cassar-Malek I., 2013. Invalidation ciblée d'un gène biomarqueur de la tendreté de la viande bovine dans le modèle souris. Journée des doctorants et post doctorants de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores, Clermont-Ferrand (Theix) - 05 Février 2013. (*Résumé et affiche*).
- [11] Kammoun M., Picard B., Henry-Berger J., Cassar-Malek I., 2012. Utilisation des outils de bio-informatique pour révéler des protéines partenaires de Hsp27. Viande et produits carnés (Hors série). Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes, Caen 13 et 14 Novembre 2012. (*Résumé et affiche*).
- [12] Kammoun M., Picard B., Cassar-Malek I., 2012. Invalidation ciblée d'un gène biomarqueur de la tendreté de la viande bovine dans le modèle souris. Journée des doctorants et post doctorants de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores, Clermont-Ferrand (Theix) - 01 Juin 2012. (*Résumé et communication orale*).
- [13] Jurie C., Picard B., Micol D., Kammoun M., Hocquette J.F., 2011 Contractile and metabolic properties of muscles from young bulls of different beef breeds. 4th annual general assembly *ProSafeBeef*, October 6th – 7th 2011. Aberystwyth, Wales - UK.

- [14] Picard B., Kammoun M., Jurie C., Micol D., Hocquette J.F., Cassar-Malek I., 2011. Biological markers of beef tenderness in young bulls from different breeds. 4th annual general assembly *ProSafeBeef*, October 6th – 7th 2011. Aberystwyth, Wales - UK.
- [15] Picard B., Cassar-Malek I., Kammoun M., Jurie C., Micol D., Hocquette J.F., 2011. Protein markers of beef tenderness in young bulls from different French breeds. 62nd Annual meeting EAAP, August 29th – September 2nd 2011. Stavanger – Norway.
- [16] Jurie C., Picard B., Micol D., Listrat A., Kammoun M., Hocquette J.F., 2011. Muscle characteristics from young bulls of different beef breeds. 57th International Congress of Meat Science and Technology, August 7th – 12th 2011, Ghent – Belgium
- [17] Picard B., Kammoun M., Cassar-Malek I., Jurie C., Dunoyer N., Leibovitch M.-P., Leibovitch S., 2011. Study of eIF3f factor and some of its targets over foetal muscle development in cattle. 2nd workshop meeting COST Action 925, August 22nd – 23rd 2011, Posieux - Switzerland. (*Résumé et communication orale*).
- [18] Kammoun M., Picard B., Cassar-Malek I., 2011. Targeted invalidation of a gene bio-markers of beef tenderness in the mouse model. 2nd workshop meeting COST Action 925, August 22nd – 23rd 2011, Posieux - Switzerland. (*Résumé et communication orale*).
- [19] Kammoun M., Cassar-Malek I., Picard B., 2011. Invalidation ciblée d'un gène bio-marqueur de la tendreté de la viande bovine dans le modèle souris. Journée des doctorants et post doctorants de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores, Clermont-Ferrand (Theix) - 29 Juin 2011. (*Résumé et communication orale*).
- [20] Kammoun M., Cassar-Malek I., Picard B., 2011. Invalidation ciblée d'un gène bio-marqueur de la tendreté de la viande bovine dans le modèle souris. Journées de l'école doctorale Sciences de la vie et de la santé, Clermont-Ferrand – 21 et 22 avril 2011. (*Résumé et affiche*).
- [21] Picard B., Kammoun M., Jurie C., Gentes G., Barboiron C., Hocquette J.F., Cassar-Malek I., 2010. Marqueurs biologiques de tendreté de la viande bovine dans les races Angus, Limousine et Blonde d'Aquitaine. Viande et produits carnés (Hors série). Journées Sciences du Muscle et Technologies des Viandes, Clermont-Ferrand – 19 et 20 Octobre 2010. (*Résumé et affiche*).

Liste des abréviations

ADP :	Adénosine diphosphate
Aldh2 :	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
AMP :	Adénosine monophosphate
Amuvi :	Animal Muscle Viande
Apaf :	Apoptotic peptidase activating factor
Ar :	Androgen receptor
ATP :	Adénosine triphosphate
Ca ²⁺ :	Calcium
Casq1 :	Calsequestrin-1
ES :	Souches Embryonnaires
GAPDH:	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
HADH :	Hydroxyacyl CoA-dehydrogenase
Hse :	Heat shock elements
Hsps :	Heat shock proteins
INRA :	Institut National de la Recherche Agronomique
kDa :	Kilodalton
KO :	Knock-Out
LDH :	Lactate dehydrogenase
LT :	<i>Longissimus Thoracis</i>
MAPK :	Mitose Activated Protein Kinase
MDa :	Millidalton
MIMI :	Michigan Molecular interactions
MLC :	Myosin Light Chain
MMP :	Matrix Metallopeptidase
MyBP :	Myosin Binding Protein
MyHC :	Myosin Heavy Chain

PBES :	Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris
PGM :	Phosphoglucomutase
pH :	Potentiel hydrogène
pHu :	Potentiel hydrogène ultime
Prdx6 :	Peroxyredoxine 6
QuaPa :	Qualité des Produits Animaux
ROS :	Reactive oxygen species
SDH :	Succinate dehydrogenase
sHsps :	Small Heat shock proteins
Sod1 :	Superoxyde dismutase
Srl :	Sarcalumenin
ST :	Semitendinosus
STRING :	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
Tm :	Tropomyosin
Tn :	Troponin
TnC :	Troponin C
TNF :	Tumor necrosis factor
TnI :	Troponin I
TnT :	Troponin T
UMRH :	Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores
WB :	Warner-Bratzler

Liste des illustrations

- Figure 1.** Organisation anatomique du muscle squelettique (A) et ultrastructure de la fibre musculaire (B – D)
- Figure 2.** Ultrastructure microscopique et composition protéique du sarcomère dans le muscle strié
- Figure 3.** Classification des fibres musculaires de muscle bovin révélant les isoformes de chaînes lourde de Myosine (MyHC) par la technique d’immunohistochimie
- Figure 4.** Evolution de l’ultrastructure du muscle *Longissimus thoracis* de bovin au cours de la maturation de la viande
- Figure 5.** Pyramide de hiérarchisation des caractères de sélection par ordre d’importance (Flamion, 2012)
- Figure 6.** Test de Warner-Bratzler (WB)
- Figure 7.** Caractéristiques des fibres influençant la tendreté
- Figure 8.** Les différentes phases de l’évolution de la dureté du muscle au cours du temps après l’abattage
- Figure 9.** Voies d’activation de l’apoptose par les Caspases
- Figure 10.** La qualité sensorielle de viande bovine, une fonction complexe de production, de transformation et de préparation de la viande
- Figure 11.** Stratégie utilisée à l’Inra pour identifier des marqueurs de tendreté de la viande bovine
- Figure 12.** Interactomes musculaires construits à partir de 24 marqueurs protéiques de tendreté
- Figure 13.** Comparaison schématique de la structure des protéines Hsp90, Hsp70 et Hsp40
- Figure 14.** Comparaison schématique de la structure des protéines Hsp20, Hsp27 et α B-crystalline
- Figure 15.** Stratégie suivie au cours de la thèse
- Figure 16.** Validation de l’hétérozygotie des cellules souches embryonnaires

- Figure 17.** Phénotype macro /microscopique des souris mâles KO HspB1 à 12 semaines d'âge
- Figure 18.** Evolution de l'ultrastructure du muscle à T72 h *post-mortem*
- Figure 19.** Stratégie d'analyse bio-informatique pour prédire les interacteurs de Hsp27 impliqués dans la tendreté
- Figure 20.** Effet de l'invalidation du gène HspB1 sur l'abondance de ces interacteurs dans le muscle *Soleus*
- Figure 21.** Analyse du protéome musculaire des souris KO HspB1
- Figure 22.** Les différentes approches suivies au cours de mes travaux de thèse
- Figure 23.** Implication de Hsp27 dans les voies apoptotiques
- Tableau 1.** Les familles de protéines de choc thermique chez les mammifères
- Tableau 2.** Les petites chaperonnes et la tendreté de la viande
- Tableau 3.** Effet de l'absence de la protéine Hsp27 sur les autres membres de la famille des Hsps en fonction du type du muscle

Introduction générale

L'une des missions de l'Unité Mixte de Recherches sur les Herbivores (UMRH) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) est de contribuer au développement de systèmes durables d'élevage des herbivores qui devront concilier l'efficacité des productions, la qualité des produits et la variabilité socio-économique avec la protection et la valorisation de l'environnement et le bien-être animal. Dans ce contexte, les travaux de l'équipe Animal Muscle Viande (Amuvi) de l'UMRH ont pour objectifs d'optimiser l'efficacité alimentaire de l'animal et les qualités sensorielles et nutritionnelles du produit muscle-viande par les facteurs d'élevage afin de proposer des solutions à la filière (producteurs, transformateurs, consommateurs).

La qualité sensorielle de la viande bovine est un critère important d'appréciation par les consommateurs qui demeurent insatisfaits en particulier de la tendreté. Ce point représente un problème majeur pour la filière bovine qui est confrontée à la concurrence des viandes blanches offrant un rapport qualité / prix plus intéressant pour les consommateurs. L'origine complexe et multifactorielle de cette qualité la rend difficilement maîtrisable par la filière bovine. Les recherches conduites durant ces dernières années ont montré que cette variabilité est la conséquence d'une part de facteurs propres à l'animal (race, sexe, âge) et à ses conditions de production et d'autre part aux conditions d'abattage et de maturation de la viande. De plus, les caractéristiques connues pour leur rôle dans la tendreté (fibres, collagène, lipides) n'expliquent qu'un maximum de 25 % de variabilité de la tendreté.

Les recherches conduites dans l'équipe ont permis d'établir une liste de marqueurs de la qualité de la viande bovine à l'issue de différents projets en biologie intégrative associant différentes approches (biochimique, protéomique, transcriptomique et bio-informatique), afin de déterminer des indicateurs d'efficacité de production et de qualité des viandes. Ces marqueurs seront intégrés dans des outils utilisables pour le phénotypage (puces à ADN ou à protéines).

Dans cette liste, les Heat Shock Proteins (Hsp) figurent à des « carrefours » biologiques dans l'interactome musculaire lié à la tendreté. Parmi elles, la Hsp27 est différentiellement exprimée entre des muscles de tendreté extrême.

Ma thèse a consisté à comprendre le rôle de Hsp27 et de ses interacteurs dans l'établissement de la tendreté ainsi que les mécanismes cellulaires impliqués.

Dans la première partie de ce manuscrit, je vais tout d'abord décrire les connaissances sur le muscle squelettique, la transformation du muscle en viande et la relation entre les caractéristiques musculaires et la qualité de la viande. Je m'intéresserai ensuite à l'étude des marqueurs biologiques de la tendreté de la viande. Enfin, j'aborderai les Heat Shock Proteins et leur relation avec la tendreté.

La deuxième partie de ce manuscrit sera consacrée aux résultats expérimentaux obtenus au cours de ma thèse, sous forme de 4 articles commentés.

Enfin, la troisième partie du manuscrit sera dédiée à une discussion générale des résultats et de leur implication pour la production de viande.

Introduction bibliographique

Chapitre I : Qualité de la viande bovine

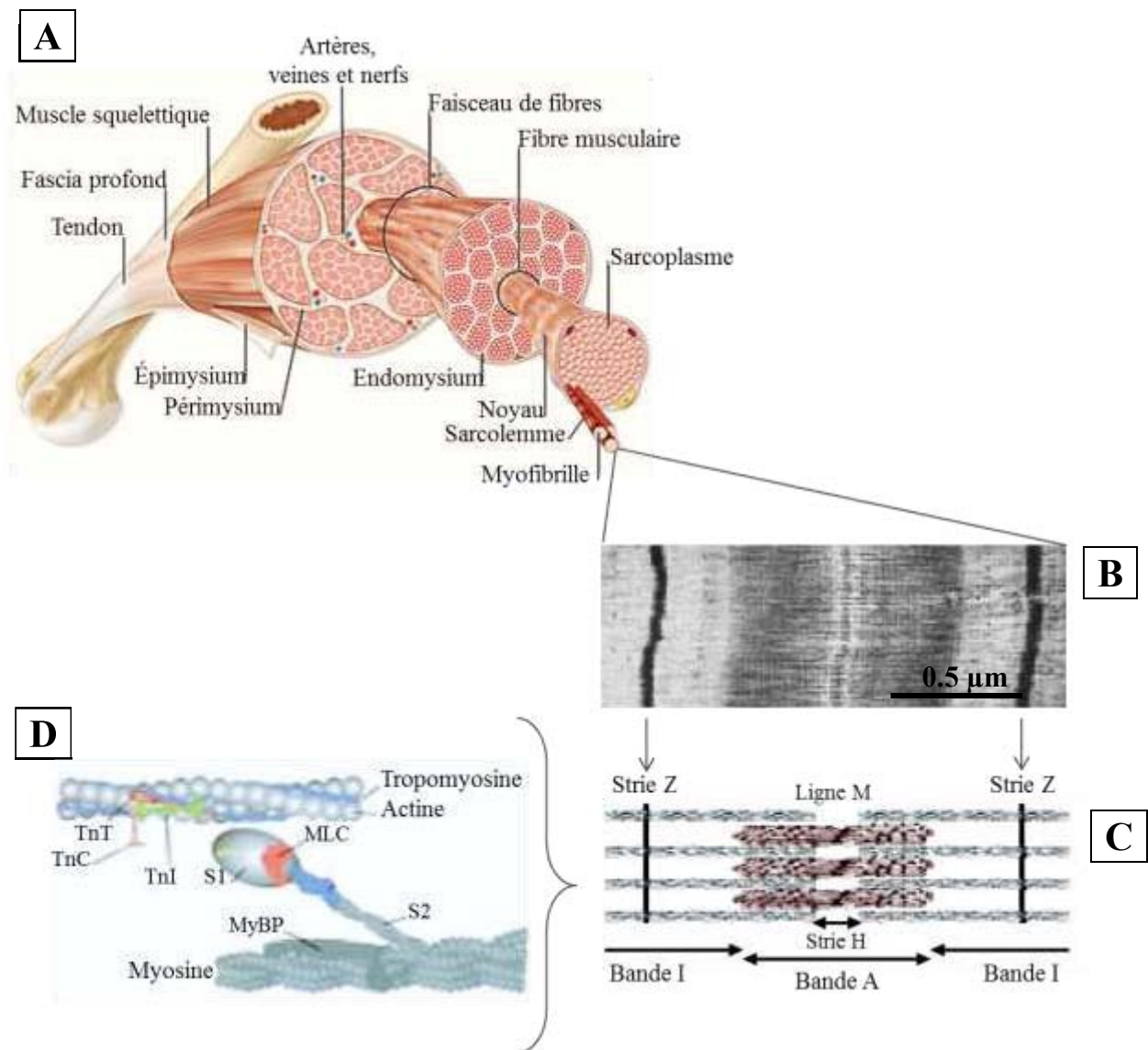


Figure 1. Organisation anatomique du muscle squelettique (A) et ultrastructure de la fibre musculaire (B – D)

- A. Représentation schématique d'une coupe transversale de muscle
- B. Coupe longitudinale de muscle observée en « Microscopie électronique » au niveau d'un sarcomère
- C. Organisation moléculaire d'un sarcomère
- D. Représentation schématique d'un filament épais constitué de molécules de myosines et d'actine

Tn: Troponine ; MLC: Chaîne légère de myosine ; MyBP: Protéine de liaison de la Myosine;

S1 et S2: tête globulaire, site d'hydrolyse de l'ATP

I. Le muscle squelettique

I.1. Structure et fonctions

Le muscle squelettique strié présente une structure biologique très complexe (Harper, 1999) et hiérarchisée (Figure1). Il est principalement composé de faisceaux de cellules pluri-nucléées. Les fibres musculaires occupent 75 à 90 % du volume musculaire. Chaque fibre musculaire est entourée par une enveloppe conjonctive : l'endomysium. Les faisceaux de fibres sont délimités par le périmysium. Enfin, le muscle est gainé par l'épimysium, enveloppe qui attache le muscle à l'os par le tendon. Ces différentes enveloppes de tissu conjonctif ont un rôle moteur important. De plus, chaque fibre est innervée par un nerf moteur et les nutriments nécessaires à la contraction sont apportés par des vaisseaux sanguins (Jurie and Listrat, 2010). Le rôle premier du muscle squelettique est d'assurer les mouvements volontaires du corps, par contraction / décontraction de sa structure, entraînant le mouvement des os. Il permet ainsi la posture et la locomotion de l'organisme. Des dysfonctionnements et des dégénérescences musculaires sont la cause de myopathies, entraînant le plus souvent des défauts graves de locomotion, et parfois la mort. Le muscle est également un thermorégulateur de l'organisme, puisque la contraction musculaire permet de produire de la chaleur. C'est aussi le tissu noble précurseur de la viande (Denoyelle, 2008) chez les animaux d'intérêt agronomique.

I.2. Ultrastructure

Chaque fibre musculaire est elle-même constituée de myofibrilles qui occupent 80 % du volume de la cellule (Figure1 A). Elles sont liées à la membrane plasmique de la fibre, le sarcolemme, par les mêmes structures. Les espaces laissés par les myofibrilles sont occupés par le sarcoplasme, majoritairement constitué d'eau (75 à 85 %) qui contient les organites cellulaires comme les noyaux, les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique Il contient également des molécules tels que du glycogène, de la phosphocréatine, des acides gras, de la myoglobine ou encore des vitamines et oligoéléments.

Au microscope électronique, les myofibrilles apparaissent constituées de deux sortes de filaments : les filaments fins et les filaments épais (Figure 1 B, C). Les filaments épais, de 100 Å de diamètre, sont constitués de Myosine. Les filaments fins, de 50 Å de diamètre, sont constitués d'Actine. La bande I (Isotrope) est constituée de filaments fins d'Actine. La ligne A (Anisotrope) est caractérisée par le chevauchement des filaments de Myosine par les

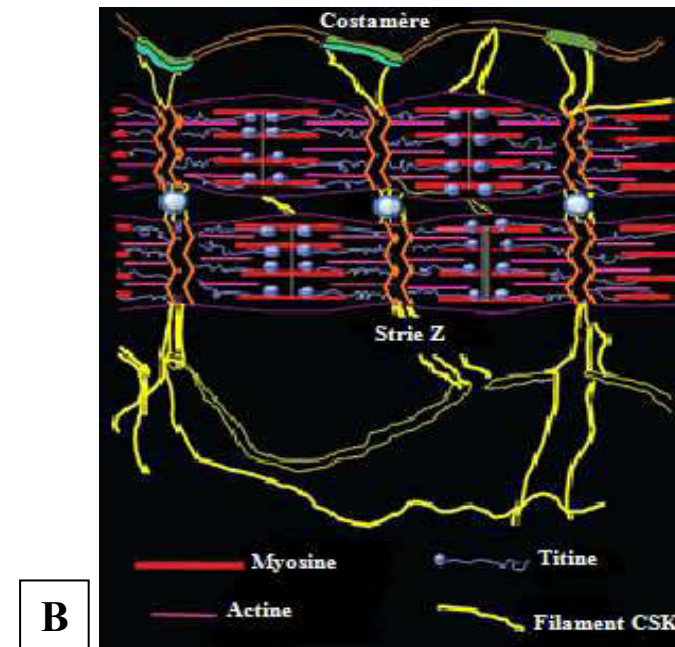
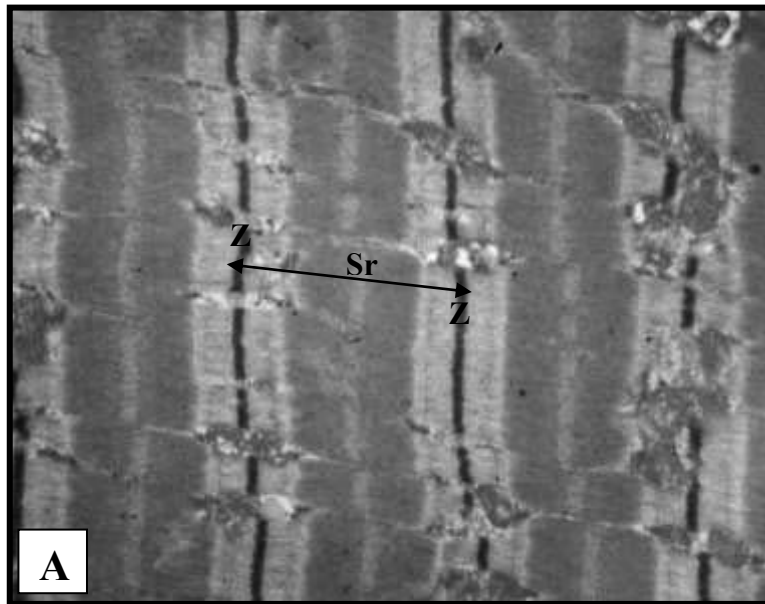


Figure 2. Ultrastructure microscopique et composition protéique du sarcomère dans le muscle strié

A. Image représentative des fibres musculaires du muscle strié obtenue par microscopie électronique à transmission.

B. Représentation schématique détaillée des molécules constituant un ensemble de sarcomères

(Adapté de *Frontiers in Bioscience E1*, 189-199, 2009)

Z = Strie Z ; Sr = Sarcomère ; CSK = Filament extra-sarcomérique du cytosquelette.

filaments d'Actine. Le chevauchement des filaments fins ne portant pas sur toute la longueur des filaments épais, il existe une zone où les filaments de Myosine sont seuls : c'est la strie H. Les structures protéiques maintenant les filaments épais forment la ligne M, au sein de la bande A. Les filaments fins d'Actine sont reliés entre-eux par une structure protéique, la ligne Z encore appelée strie Z ou disque Z. l'espace entre 2 stries Z délimite le sarcomère (Figure 1, 2) qui constitue la plus petite unité contractile de la fibre musculaire (Agarkova and Perriard, 2005). La strie Z constitue le point d'ancrage des filaments fins d'Actine et des filaments de Titine (Clark *et al.*, 2002). La strie Z (composée de protéines telles que l' α -actinine, la spectrine, myotiline, myopalladine, γ -filamine, téléthonine, Desmine, Titine (partie N-terminale)) ne se réduit pas à son rôle de structure, mais possède également un rôle dans la signalisation cellulaire (Taylor *et al.*, 1995). L'intégrité du costamère est essentielle au bon fonctionnement du muscle.

I.2.1. Les filaments épais

Les filaments épais, localisés dans la bande A, sont composés de Myosine. Cette protéine est constituée de chaînes lourdes et de chaînes légères. Les deux chaînes lourdes (MyHC) sont associées à leur extrémité C-terminale en hélice α , formant ainsi la queue de la molécule (Figure 1D). Au niveau de leur extrémité N-terminale, ces deux chaînes se séparent et s'associent à deux chaînes légères (MLC), formant une structure globulaire qui constitue la tête de la molécule. Les têtes de Myosine portent un site de fixation à l'Actine et une activité ATPasique, impliquée dans la contraction musculaire (Clark *et al.*, 2002). Les filaments épais sont ancrés à la strie Z et à la ligne M (Figure 1 C, D). La longueur des filaments est régulée par la Titine. La partie N-terminale de cette grande protéine de 3 MDa est fixée sur la strie Z et sa partie C-terminale sur la ligne M. Cela permet ainsi de maintenir l'alignement du sarcomère durant la contraction musculaire. Cette protéine est donc un acteur essentiel dans la longueur et l'orientation du filament épais. La MyBP-C établit un lien entre le filament de Myosine et la Titine. L'adénosine monophosphate déaminase est fixée sur les chaînes lourdes de Myosine ainsi que la Titine. Elle est impliquée dans les modifications métaboliques du muscle, dont la régulation est importante pour le bon fonctionnement musculaire. Des mutations dans le gène de l'AMP-déaminase induisent des myopathies.

I.2.2. Les filaments fins

Les filaments fins forment les bandes I caractéristiques des myofibrilles et sont reliés entre eux par la strie Z (Figure 1 B, C et 2). Ils sont principalement composés d'Actine et de protéines régulatrices : la Tropomyosine (Tm) et la Troponine (Tn). L'Actine est un polypeptide formé de plusieurs sous-unités globulaires d'Actine G, polymérisées en longs brins d'Actine F qui s'enroulent en double hélice pour former le filament fin. La Tropomyosine est un dimère formée de deux sous-unités : l' α -Tropomyosine et la β -Tropomyosine. La Troponine est une protéine formée de trois sous-unités : la Troponine I (TnI) qui se lie à l'Actine et inhibe l'interaction Actine-Myosine, la Troponine T (TnT) qui se fixe à la Tropomyosine et stabilise le complexe Tn-Tm-Actine, et la Troponine C (TnC) qui se lie aux ions Ca^{2+} lors de la contraction musculaire et régule l'inhibition exercée par la TnI (Gordon 2000). Ces filaments ont une structure en double hélice et sont orientés au sein du filament fin (Clark *et al.*, 2002). En effet, la fibre d'Actine n'est pas figée, elle est dans une dynamique d'association/dissociation. L'extrémité qui croît le plus rapidement est appelée l'extrémité barbelée. Cette extrémité est située du côté de la strie Z. L'autre extrémité, à la vitesse de croissance plus faible, est appelée extrémité pointue. Cette extrémité est du côté de la ligne M. La régulation de cette dynamique est essentielle au maintien de la longueur uniforme du filament fin. La structure du sarcomère est également assurée par d'autres protéines, plus minoritaires, telles que la Titine qui régule l'élasticité de la contraction, la Nébuline, la Desmine, l' α -Actinine et la Myoméline.

I.2.3. Myofilaments et contraction musculaire

La contraction musculaire se produit lorsque les fibres musculaires sont dépolarisées en réponse à un stimulus nerveux, transmis à la fibre *via* la plaque motrice et propagé dans toute la cellule par le sarcolemme (pour revue : Gordon *et al.*, 2000). Les ions calcium Ca^{2+} sont relargués dans le reticulum sarcoplasmique. Ces ions vont se fixer à la Troponine, ce qui va modifier sa conformation. La Tropomyosine, associée à la Troponine, va également subir une modification de sa conformation, ce qui va découvrir le site de fixation de la Myosine sur l'Actine et permettre l'association des deux protéines. Le mouvement de la tête de Myosine va ainsi faire glisser le filament fin vers le filament épais et raccourcir le sarcomère. En conséquence, les bandes I se raccourcissent et les bandes A gardent la même longueur. Un sarcomère contracté voit sa taille diminuer de 70%. L'association entre l'ATP et la Myosine

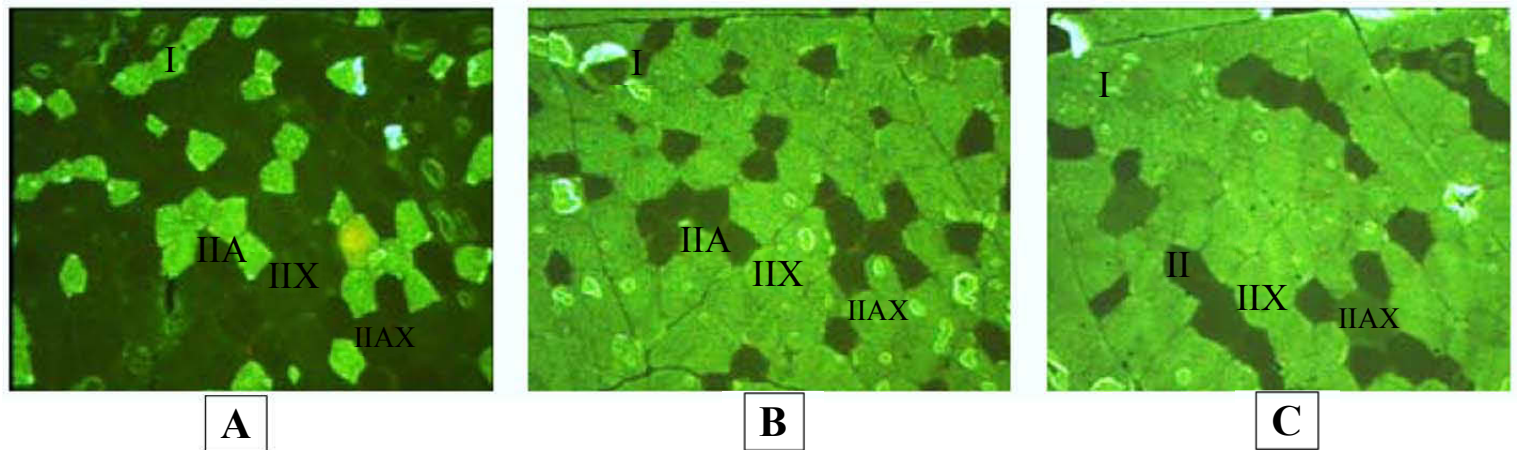


Figure 3. Classification des fibres musculaires de muscle bovin révélant les isoformes de chaînes lourde de Myosine (MyHC) par la technique d'immunohistochimie

- A. En utilisant un anticorps qui reconnaît la MyHC lente I (En vert)
- B. En utilisant un anticorps qui reconnaît les MyHC rapides IIA et IIX (En vert)
- C. En utilisant un anticorps qui reconnaît les MyHC I et IIX (En vert)

La comparaison des différentes coupes sériées permet de distinguer des fibres hybrides (IIAX) qui contiennent les deux isoformes de chaînes lourdes de myosine IIA et IIX (Picard et al., 1998).

provoque une diminution de l'affinité de cette dernière pour l'Actine, et un détachement de la tête de Myosine, qui pourra alors fixer une autre molécule d'Actine et poursuivre le mouvement contractile. Les chaînes lourdes jouent un rôle important dans la contraction musculaire. C'est au niveau des MyHC que se situe l'activité ATPasique de la Myosine qui va fournir l'énergie nécessaire à la contraction musculaire par hydrolyse de l'ATP (Figure 2). Ainsi, la molécule de Myosine joue un rôle important dans la contraction musculaire. La vitesse de contraction dépend des isoformes de Myosines qui sont la base de la classification des fibres.

I.3. Propriétés contractiles et métaboliques

La Myosine, protéine majeure du tissu musculaire, représente environ la moitié des protéines myofibrillaires. Dans le muscle squelettique, les fibres musculaires, diffèrent par leurs caractéristiques métaboliques et contractiles notamment par leur composition en Myosine. Ainsi, l'activité contractile des fibres est plus ou moins rapide selon la nature de l'isoforme de MyHC qu'elles contiennent. Le type contractile peut donc être déterminé en mesurant l'activité ATPasique des fibres ou encore, en révélant les différentes isoformes de MyHC à l'aide d'anticorps spécifiques (pour revue Schiaffino et Reggiani, (2011) ;(Picard *et al.*, 1998) (Figure 3). La contraction musculaire se fait grâce aux nutriments utilisés pour la production d'énergie. Il existe deux formes de nutriments apportés par la circulation sanguine : les glucides (glucose, glycogène...) et les lipides (acides gras non estérifiés, triglycérides, acides gras volatiles et corps cétoniques). Il existe aussi des réserves à l'intérieur des muscles (glycogène et triglycérides). Selon les nutriments utilisés, la production d'énergie pour la contraction peut emprunter deux voies métaboliques, oxydative (aérobie) ou glycolytique (anaérobie). L'association du type contractile et métabolique permet de distinguer 3 principaux types de fibres comme par exemple chez le bovin après la naissance (Figure 3):

- des fibres lentes à métabolisme oxydatif (I)
- des fibres rapides à métabolisme oxydo-glycolytique (IIA)
- des fibres rapides à métabolisme glycolytique (IIX) (Picard, 2012).

Ainsi dans ce chapitre, nous venons de voir que les protéines musculaires confèrent au muscle squelettique son organisation structurale fine et ses propriétés contractiles et métaboliques.

II. Du muscle à la viande

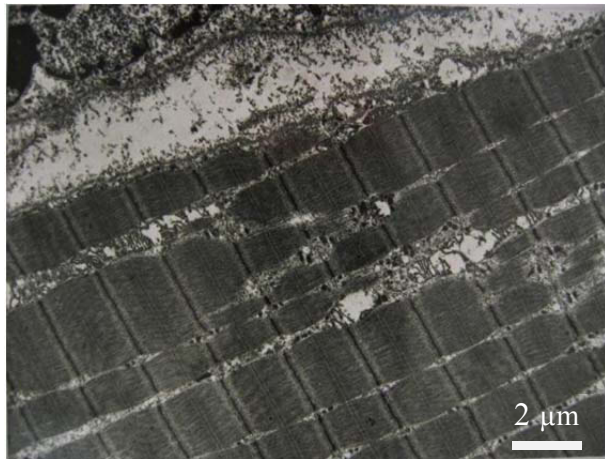
Après la mort, des changements s'opèrent dans le muscle. Ils font appel à un ensemble de processus de nature à la fois enzymatique et physico-chimique. C'est la transformation du muscle en viande chez les animaux d'intérêt agronomique. Ces changements ont une grande importance pour les qualités sensorielles de la viande (Ouali *et al.*, 2006 ; Valin, 1988). Au cours de sa transformation, le muscle passe successivement par trois états différents.

II.1. L'état pantelant

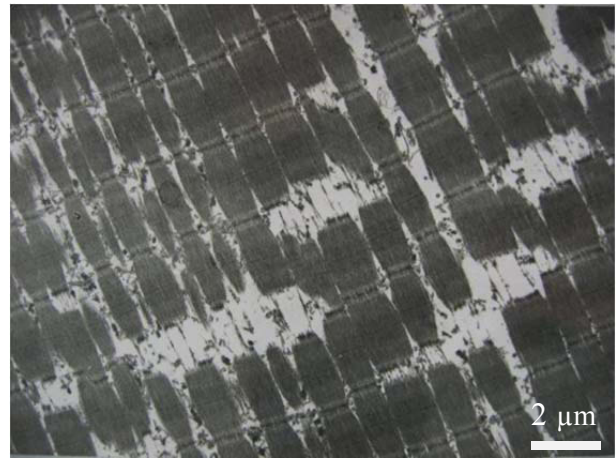
L'état pantelant dure de 20 à 30 minutes pendant lesquelles les contractions persistent. Cet état correspond à la durée de survie du système nerveux où le muscle dépend encore de ses réserves en glycogène.

II.2. La *rigor mortis*

La *rigor mortis* ou rigidité cadavérique s'installe progressivement avec la disparition de la première phase, et se traduit par une perte de l'élasticité. Elle se caractérise par des tissus musculaires plus durs, inextensibles et des axes osseux plus difficiles à déplacer chez l'animal. C'est la résultante de l'acidification du tissu musculaire, due à une chute du pH par utilisation et régénération des réserves en ATP et de la contraction des fibres musculaires (Maltin *et al.*, 2003). Au niveau myofibrillaire, ce phénomène se traduit par une diminution de la longueur des sarcomères. En effet, en raison de l'arrêt de l'apport d'oxygène, le muscle s'oriente vers un métabolisme anaérobie, conduisant à la production d'acide lactique pour récupérer les réserves d'ATP jusqu'à l'épuisement des réserves énergétiques (glycogène) et l'inhibition des enzymes de la glycolyse, responsables de la dégradation du glycogène (Ouali, 1991). L'accumulation de l'acide lactique entraîne ainsi l'abaissement du pH dont la vitesse et l'amplitude d'évolution auront une très forte incidence sur la qualité finale de la viande. Cette baisse de pH est également à l'origine de l'inhibition des enzymes responsables de la lyse de l'ATP provoquant une fuite de calcium dans le réticulum qui, à forte concentration, induit la formation du complexe Actine-Myosine, d'où la contraction du muscle. Les réserves énergétiques du muscle étant épuisées, la dissociation de ces complexes ne peut plus avoir lieu. Le muscle se durcit, la rigidité cadavérique s'installe. Au bout de 24 heures, le pH ultime est stable (pH=5,5) et le muscle atteint son maximum de dureté (Ouali, 1991).



A



B

Figure 4. Evolution de l'ultrastructure du muscle *Longissimus thoraci* de bovin au cours de la maturation de la viande

A. Ultrastructure du muscle à T0 heure *post-mortem*

Les myofibrilles présentent une structure bien définie et intacte avec des stries Z alignées

B. Ultrastructure du muscle 14 jours *post-mortem*

On remarque un changement de l'ultrastructure au cours de la maturation de la viande. Ce changement est caractérisé par des ruptures au niveau de la strie Z et un décalage entre les stries Z.

Photos de Thierry Astruc, INRA, QuaPa

II.3. La maturation

Il s'agit de l'étape la plus importante car elle conduit à une augmentation de la tendreté (attendrissage) de la viande. La maturation met en jeu différents systèmes protéolytiques endogènes, qui seront abordés dans le chapitre III.2.4, conduisant à des altérations de la structure et de la composition biochimique des muscles (Harper, 1999). En effet, sous l'action des enzymes protéolytiques et consécutivement à la diminution du pH et à l'augmentation de la pression osmotique, il y a dénaturation des protéines myofibrillaires et du cytosquelette. Ceci a pour conséquence la rupture des liens inter- et intra-myofibrilles, des liaisons myofibrille/sarcolemme, et de l'attachement des cellules musculaires à la lame basale (Figure 4) (pour revue de Guillemain *et al.*, 2009). Il s'agit d'une protéolyse ménagée qui détend le muscle, ayant pour conséquence l'attendrissage de la viande qui retrouve sa dureté de base. Cette dureté de base est proportionnelle à la teneur du collagène intramusculaire qui subit peu de transformations au cours de la maturation.

L'attendrissage est donc dû à des modifications des myofibrilles et du cytosquelette. La disparition des réserves énergétiques du muscle et l'acidification du milieu placent les différentes fractions protéiques dans des conditions favorables à leur dénaturation et par la suite une augmentation de la sensibilité aux enzymes protéolytiques (Coibion, 2008).

III. La tendreté : critère principal d'appréciation de la viande bovine

Le muscle subit des transformations *post-mortem* conduisant à la mise en place des qualités sensorielles de la viande (caractéristiques que le consommateur peut percevoir directement grâce à ses sens).

Le cerveau humain est capable d'évaluer et de dissocier trois dimensions de la perception sensorielle qui sont évoquées dans la norme AFNOR¹ XP V 09-501 (AFNOR, 2010) :

- qualitative, qui est la caractéristique de ce qui est perçu (goût salé, arômes, etc.) ;
- quantitative, qui représente l'intensité de la sensation (peu, beaucoup, intensément) ;
- hédonique, qui caractérise le plaisir global ressenti par le consommateur (j'aime, je n'aime pas).

¹ Association française de normalisation

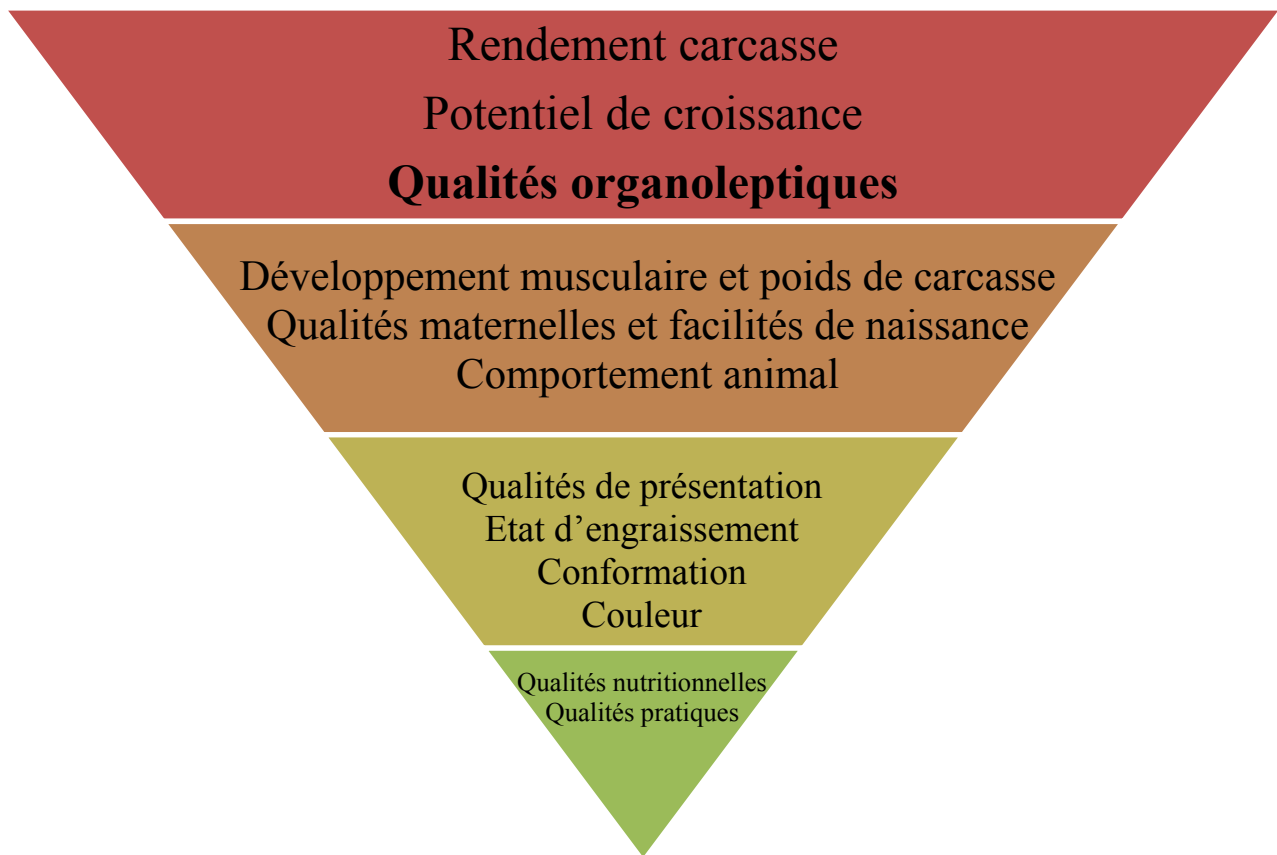


Figure 5. Pyramide de hiérarchisation des caractères de sélection par ordre d'importance (Flamion, 2012)

Le pyramide des caractères de sélection montre que les qualités organoleptiques (tendreté, jutosité et flaveur) obtiennent les meilleurs scores, les plaçant au même niveau d'importance que le rendement carcasse et le potentiel de croissance. Cette enquête a été menée dans le but de recueillir les opinions des acteurs de la filière sur la qualité de viande.

Pour le produit viande, les principales caractéristiques sensorielles sont la couleur, la tendreté, la jutosité et la flaveur (Touraille, 1994). Pour la viande bovine, c'est la tendreté qui est la qualité la plus recherchée par le consommateur. Mais la couleur conditionne l'acte d'achat.

La tendreté de la viande est considérée comme la propriété organoleptique qui traduit la facilité avec laquelle la structure de la viande peut être désorganisée au cours de la mastication (Ouali *et al.*, 2006). D'autres la définissent comme « une somme de sensations perçues lors de la mastication » (Evrat-Georgel, 2008). Il peut s'agir encore de la résistance que présente la viande au tranchage ou à la mastication, on parle alors de dureté. La tendreté compte parmi les critères organoleptiques les plus importants pour le consommateur mais elle présente une variabilité forte et non maîtrisée. Son impact commercial est très important même si les producteurs ne sont pas payés à la qualité. Récemment, une enquête menée par l'Institut de l'Elevage, dans le but de recueillir les opinions des acteurs de la filière sur la qualité de la viande, a montré que les qualités sensorielles (tendreté, jutosité et flaveur) se situent au même niveau d'importance que le rendement carcasse et le potentiel de croissance, deux critères pour lesquels les acteurs de la filière ont de fortes attentes et pour lesquels une sélection est déjà réalisée (pour revue de Flamion (2012)) (Figure 5).

Actuellement, la tendreté ne peut être estimée qu'après l'abattage de l'animal par des mesures mécaniques qui reposent sur les propriétés physiques ou rhéologiques de la viande (cisaillement, compression) ou par des tests d'analyse sensorielle (Evrat-Georgel, 2008; Guillemin *et al.*, 2009).



A



B



C

Figure 6. Test de Warner-Bratzler (WB)

Le test de WB est un test de cisaillement utilisé internationalement pour évaluer la tendreté de la viande. La mesure effectuée lors de ce test est la force de contrainte nécessaire pour faire passer la lame perpendiculairement aux fibres musculaires d'un échantillon.

- A. Lame en V inversée de 1,016mm utilisée pour le test
- B. Echantillons de 1,27cm de diamètre découpés dans le steak à analyser
- C. Mise en place du test sur un échantillon

La valeur de la force maximale nécessaire au cisaillement de l'échantillon est mesurée. La mesure de la force de cisaillement de la viande cuite permet de se rapprocher des attentes et de la perception des consommateurs (Wheeler et al, 2004).

IV. Mesures de la tendreté

Les méthodes de mesures physiques de la tendreté font appel à des instruments qui tentent de simuler certaines sensations du consommateur pendant la mastication, puis de les mesurer. Il s'agit pour la plupart des tests mécaniques de mesurer la résistance ou l'amplitude de la déformation du produit à différents types de forces qui lui sont appliquées. Selon le cas, ces mesures sont réalisées sur des échantillons de viande crue ou cuite. De nombreux tests mécaniques sont disponibles pour mesurer la dureté de la viande, par exemple : le test de cisaillement, de compression, de tension, de morsure, la pénétrométrie et le découpage par lames multiples (Lepetit and Culioli, 1994). Le test de cisaillement Warner-Bratzler (WBSF : (Bratzler, 1958) est le test le plus utilisé à travers le monde pour mesurer la tendreté de la viande.

C'est un test direct de mesure de la résistance de la viande sur viande crue ou cuite (Figure 6). L'utilisation de la viande cuite permet de se rapprocher des attentes des consommateurs. La tendreté de la viande est la résultante de nombreux facteurs, et son évaluation ne peut être réduite à ce seul paramètre mécanique. C'est pourquoi dans de nombreuses études, le test sensoriel faisant intervenir un jury de dégustateurs entraînés à juger de la qualité des viandes dont la tendreté, est préférentiellement employé. C'est la méthode la plus directe qui consiste à examiner les propriétés organoleptiques et la qualité hédonique de la viande par les organes des sens (Evrat-Georgel, 2008 ; Guillemain *et al.*, 2009).

De nombreuses études (Chambaz *et al.*, 2003 ; Lorenzen *et al.*, 2003 ; Rhee *et al.*, 2004; Shackelford *et al.*, 1991 ; Silva *et al.*, 1999 ; Wheeler *et al.*, 1997 ; Whipple *et al.*, 1990) ont mis en évidence des corrélations négatives (- 0,60 en moyenne, allant de - 0,26 à - 0,95) entre les résultats obtenus par les mesures mécaniques et sensorielles sur viande cuite. La corrélation génétique est toutefois généralement plus élevée (-0,91) (Hocquette *et al.*, 2006; Johnston *et al.*, 2003; Marshall, 1999).

V. Le déterminisme de la tendreté

Les déterminants de la tendreté sont complexes et multifactoriels et dépendent de facteurs *ante-, peri- et post-mortem*. Parmi ces déterminants figurent les propriétés intrinsèques du muscle et des facteurs liés aux conditions d'abattage des animaux, de maturation et de transformation technologique qui ne seront pas abordés dans ce chapitre.

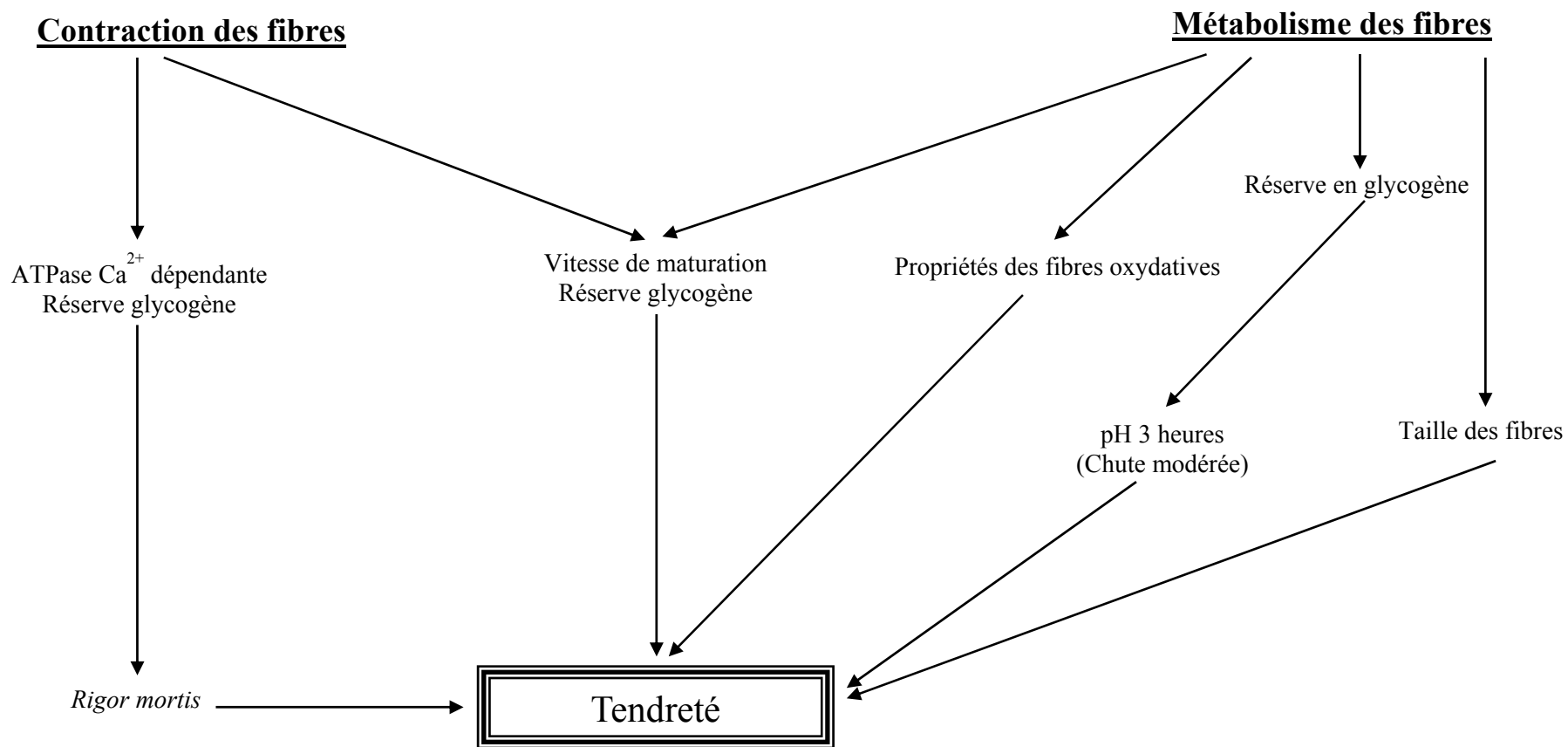


Figure 7. Caractéristiques des fibres influençant la tendreté

Propriétés intrinsèques des muscles

Les études menées depuis plus de 20 ans ont montré que la tendreté dépend, entre autres, des propriétés intrinsèques suivantes :

- des caractéristiques de la trame conjonctive (collagène surtout) responsables de la dureté de base de la viande,
- des propriétés contractiles et métaboliques des fibres musculaires conditionnant la vitesse de maturation,
- des teneurs en lipides intramusculaires qui diluent les structures les plus dures du tissu musculaire,
- des activités de protéases et de leurs inhibiteurs qui conditionnent ensemble la maturation de la viande (Figure 7).

V.1. Le collagène

Chez les bovins, le collagène intramusculaire représente 1 à 10 % du poids sec du muscle. En pratique, la classification bouchère des morceaux de viande et de leur mode de cuisson dépendent directement de leur teneur en collagène : les muscles les plus riches en collagène ont tendance à fournir une viande plus dure nécessitant un temps et une température de cuisson plus élevés.

Pour une même teneur en collagène, la tendreté de la viande peut varier. En effet, la rigidité du collagène contribue aussi à la tendreté ; c'est un paramètre important à la base des tests mécaniques. Le nombre de liaisons covalentes entre les molécules de collagène joue sur sa solubilité, et par conséquent sur la tendreté. Et à même teneur, plus le collagène est soluble, plus la viande sera tendre. Cependant, il est difficile de déterminer précisément la part du collagène dans la tendreté. En effet, deux muscles présentant une teneur, composition et solubilité identique en collagène peuvent avoir des tendretés différentes (Guillemin *et al.*, 2009). La teneur en collagène varie peu avec l'âge, mais la solubilité diminue avec le vieillissement, impliquant une diminution de la tendreté (Hocquette *et al.*, 2005b). Cette teneur dépend également du type d'animal. Des taurillons âgés de 15 à 24 mois présentent une teneur en collagène 1,2 fois supérieure à celle de vaches âgées de 4 à 9 ans, en moyenne pour les deux muscles LT et ST (Picard *et al.*, 2003). Lors de la transformation du muscle en viande, le collagène ne subit que très peu de modifications.

V.2. Les fibres musculaires

Dans l'étude de Dransfield *et al* (2003) la valeur du pH à 3 heures *post-mortem* explique 0,52 % de la variation de la tendreté. Ce dernier doit connaître une baisse modérée, pour que la tendreté soit jugée bonne. En conséquence, le potentiel glycolytique des fibres constitue un critère important dans l'évolution du pH à 3 heures *post-mortem*. Les muscles les plus glycolytiques peuvent présenter une chute de pH trop rapide et sont susceptibles d'être plus défavorables à la tendreté par rapport aux muscles plus oxydatifs. Par exemple, le muscle *Longissimus thoracis*, oxydatif et plus tendre, est caractérisé par une valeur de pH plus élevée (6,4) à 3 heures *post-mortem* que le *Semitendinosus*, glycolytique et plus dur qui présente une valeur de pH plus faible (6,0). Ainsi, une baisse de 0,4 unité de pH a pour conséquence une chute de 0,7 unité de score de tendreté.

La relation entre le type de fibres et la tendreté est très complexe. Certains auteurs (Crouse *et al.*, 1991 ; Dransfield *et al.*, 2003 ; Jurie *et al.*, 2007 ; Therkildsen *et al.*, 2002 ; Zamora *et al.*, 1996) indiquent que le métabolisme oxydatif favorise la tendreté de la viande bovine. Cependant, cette relation est controversée dans d'autres études. Ces différents résultats doivent être pondérés par les différences entre les systèmes de production étudiés. Ainsi, les études menées par Maltin *et al.* (2003) et Strydom *et al.* (2000) portent respectivement sur des races anglaises croisées et sur des races sud-africaines. Les études de Zamora *et al.* (1996) et Renand *et al.* (1997) portent sur des taurillons Charolais. Quant à l'étude de Dransfield *et al.* (2003) elle a porté sur 4 races : Aubrac, Charolaise, Limousine, Salers et sur des taurillons et des vaches d'âges différents. Les propriétés musculaires varient selon le type d'animal (âge, sexe, race) et selon les systèmes de production (Schreurs *et al.*, 2008). En conséquence, les relations entre propriétés contractiles et métaboliques des muscles et la tendreté sont aussi dépendantes de ces facteurs.

De plus, l'impact du type métabolique des fibres sur la tendreté varie en fonction du muscle. Ainsi, Maltin *et al.* (2003) montrent que plus le muscle *Longissimus lumborum* est oxydatif, plus il est tendre, à l'inverse du muscle *Vastus lateralis*. L'étude de Picard *et al.* (2006) montre le même type de résultats sur les muscles *Longissimus thoracis* (LT oxydatif) et *Semitendinosus* (ST glycolytique). Elle montre en particulier que les relations entre la tendreté et les caractéristiques biochimiques sont plus marquées chez les vaches que chez les taurillons en croissance. Le muscle LT des vaches apparaît le plus tendre lorsqu'il contient le plus de

lipides totaux et de triglycérides. Il présente les propriétés les plus lentes et oxydatives, et renferme les teneurs en collagène total et collagène insoluble les plus faibles (Picard *et al.*, 2007). De manière opposée, les muscles ST les plus tendres sont ceux qui ont les activités glycolytiques (Lactate deshydrogenase, LDH) les plus élevées. Seule cette propriété apparaît être significativement corrélée à la tendreté dans ce muscle. Ainsi selon le type de muscle considéré, la tendreté de la viande peut être expliquée par des caractéristiques différentes. Une étude récente de méta-analyse réalisée sur environ 15000 mesures provenant de 6 muscles différents (*Semitendinosus*, *Semimembranosus*, *Rectus abdominis*, *Triceps brachii* et principalement *Longissimus thoracis*) issus de 5197 animaux (1-120 mois) de 20 races différentes, démontre que ces controverses s'expliquent principalement par le type de muscle considéré (Chriki *et al.*, 2012; Chriki *et al.*, 2013). Ceci permet de comprendre les nombreuses contradictions rencontrées dans la bibliographie sur les relations entre caractéristiques biochimiques et qualité sensorielle de la viande. En effet, selon les auteurs, les études ont été conduites sur des types de muscles ou d'animaux différents. Ceci montre également qu'aucune caractéristique d'un muscle donné ne peut être prédicteur de la qualité sensorielle de l'ensemble des autres muscles de la carcasse.

V.3. Les lipides

Les lipides sont présents sous la forme de triglycérides (acides gras hydrophobes saturés) et de phospholipides (lipides membranaires insaturés). La teneur en acides gras influence surtout la jutosité et la flaveur, mais aussi la tendreté de la viande car une viande riche en lipides est moins sèche qu'une viande maigre. Cependant, l'étude de Geay *et al.* (2001) a montré qu'il n'existe aucune corrélation entre les lipides et la tendreté sur viande crue et cuite. A l'inverse, Picard *et al.* (2007) ont montré qu'il existe une corrélation positive entre la teneur en lipides et la tendreté ($r = + 0.23$). Ce résultat est en accord avec les travaux de Oury *et al.* (2009) sur le muscle *Rectus abdominis* de génisses de race charolaise. La relation entre la teneur en lipides et la tendreté est très complexe (Renand *et al.*, 2001). Il est admis que la présence de lipides abaisserait la dureté en produisant un effet lubrificateur pendant la mastication, ce qui amplifierait la sensation de tendreté perçue par le consommateur.

V.4. Les systèmes protéolytiques

Le processus de protéolyse intervenant lors de la phase de maturation joue un rôle clé dans la mise en place de la tendreté. Une hypothèse a été avancée l'attendrissage de la viande serait dû aux activités synergiques des enzymes protéolytiques endogènes dans le muscle (Ouali, 1992). Les systèmes protéolytiques musculaires comprennent les Calpaïnes (calcium dépendantes) (Huff-Lonergan and Lonergan, 2005; Koohmaraie and Geesink, 2006), les Cathepsines (protéines lysosomiales), les protéasomes, les métallopeptidases (Matrix Metallopeptidases ou MMPs) et les sérines peptidases (Ouali *et al.*, 2006).

- **Les Calpaïnes**

Ce sont des peptidases à Cystéine calcium-dépendante, formant un groupe de peptidases intracellulaires important (Goll *et al.*, 2003). Cette famille a été très étudiée dans la recherche agronomique sur la viande pour son implication dans le processus protéolytique de la maturation des viandes (Koohmaraie and Geesink, 2006).

Les Calpaïnes les plus étudiées sont les μ -Calpaïnes (actives à des concentrations en calcium de l'ordre du μ M) et la m-Calpaïne (active à des concentrations en calcium de l'ordre du mM). Les μ et m-Calpaïnes sont ubiquitaires. Ce sont des hétérodimères comportant deux sous-unités : une sous-unité catalytique de 80 kDa, responsable de l'activité peptidase, unique pour chaque enzyme, et une sous-unité de 30 kDa régulatrice commune à toutes les Calpaïnes. Les μ -Calpaïnes ont une activité optimale à pH physiologique. Après abattage, l'accumulation de Ca^{2+} dans le sarcoplasme du muscle active les μ -Calpaïnes qui déstabilisent la structure du muscle par la dégradation des protéines myofibrillaires, y compris la Titine, la Filamine, la Troponine-T et la Desmine (Hopkins and Taylor, 2004; Huff-Lonergan and Lonergan, 1999). Après cette activation, la μ -Calpaïne s'autolyse progressivement et finalement devient inactive (Maddock *et al.*, 2005). Une chute du pH musculaire *post-mortem* limite aussi l'activité des μ -Calpaïnes. L'activité de ces dernières est également modérée par l'enzyme inhibitrice la Calpastatine (Goll *et al.*, 2003). En se fixant sur les sous-unités régulatrices et catalytiques, sous la dépendance des ions calcium, les Calpastatines inhibent l'action des Calpaïnes (Dargelos *et al.*, 2008). Plusieurs études ont rapporté une corrélation positive entre l'activité des Calpastatines et la dureté de la viande (Kemp *et al.*, 2010 ; Kemp and Parr, 2012) avec un retard de l'attendrissage de la viande suite à l'augmentation du rapport Calpastatine/Calpaïne (Koohmaraie *et al.*, 1991).

- **Les Cathepsines**

Les Cathepsines sont des protéases qui tiennent une place importante dans la dégradation des protéines par le lysosome. Elles forment une famille d'au moins onze membres. L'activité des Cathepsines B, H et L serait corrélée à la tendreté (Thomas *et al.*, 2004). Localisées dans les lysosomes, elles sont actives à pH allant de 3 à 6 (Etherington and Sims, 1981). Leur activité est contrôlée par leurs inhibiteurs spécifiques, les Cystatines. Le rapport Cathepsines/Cystatines est un bon indice de l'activité des enzymes.

L'activité des Cathepsines ne peut pas expliquer la variabilité de la tendreté. Toutefois, lorsque le pH musculaire *post-mortem* chute, les membranes lysosomales deviennent de plus en plus déstabilisées, entraînant ainsi la libération des Cathepsines dans le sarcoplasme favorisant l'hydrolyse des protéines myofibrillaires (Lomiwes *et al.*, 2012). L'activité des Cathepsines a été associée à la déstabilisation de la strie Z (Ouali and Talmant, 1990) et à l'hydrolyse de la Titine et la Troponine T (Zeece and Katoh, 1989).

L'activité des Cathepsines ne permet pas d'expliquer la variabilité de la tendreté, contrairement à celle des Calpaïnes. Toutefois, tout comme le rapport Calpaïne/Calpastatine, le rapport Cathepsines/Cystatine pourrait constituer un marqueur de la tendreté. L'étude de (Thomas *et al.*, 2004) a montré un rôle des Cathepsines D, B, L et H dans la mise en place de la tendreté. D'une manière plus générale, les changements de la structure myofibrillaire lors de la protéolyse ne peuvent être expliqués par un seul système protéolytique. Une action synergique des Calpaïnes et des Cathepsines est envisagée lors de la phase de maturation.

- **Les protéasomes**

Les protéasomes sont des complexes enzymatiques multiprotéiques ubiquitaires. Dans les cellules eucaryotes, ils se trouvent dans le noyau, le cytosol et associés au réticulum endoplasmique (Peters, 1994). Les protéasomes ciblent les protéines mal repliées, dénaturées ou obsolètes pour les dégrader par protéolyse. La dégradation protéasomale est un élément essentiel de nombreux processus cellulaires, notamment le cycle cellulaire, l'expression génétique et la réponse au stress oxydatif (Lodish *et al.*, 2004).

Le protéasome 20S, complexe de 700 kDa, est le cœur protéolytique des différentes formes de protéasome. Il possède plusieurs activités catalytiques : activité chymotrypsine, trypsine et peptidyl-glutamyle (Sentandreu *et al.*, 2002). Le protéasome 20S seul peut hydrolyser de

petits peptides et certaines protéines dépliées toutefois il ne peut pas dégrader de véritables substrats poly-ubiquitylés, pour lesquels il a besoin du protéasome 26S. Ce complexe 26S est constitué d'une sous-unité régulatrice (19S) et d'un complexe multi-catalytique (20S) (Dahlmann *et al.*, 2001). Le protéasome 20S joue un rôle important dans la protéolyse non lysosomiale en causant une dégradation des disques M et Z. Il dégraderait plus précisément la Troponine C et les chaînes légères de Myosine. Sa concentration dans les fibres oxydatives est plus importante que dans les fibres glycolytiques. Il serait donc un acteur important de la protéolyse des stries Z dans les fibres oxydatives lors de la maturation.

- **Matrice metallopeptidases**

Les métallopeptidases « Matrix Metallopeptidases : MMPs » forment une grande famille de metalloendopeptidases à zinc, impliquées dans le catabolisme du tissu conjonctif. Dix-huit MMPs, d'un poids moléculaire allant de 25 à 75 kDa ont été identifiées (Sentandreu *et al.*, 2002). Chaque membre de la famille des metalloendopeptidases est doté d'une fonction spécifique. Elles sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et jouent un rôle important dans l'embryogenèse et dans le remodelage tissulaire (Balcerzak *et al.*, 2001). La plupart des MMPs sont sécrétées sous une forme inactive. L'activité de ces MMPs est contrôlée par l'activation de leurs précurseurs et par l'interaction avec leurs inhibiteurs. Il existe plusieurs isoformes d'inhibiteurs de MMPs, ayant plusieurs degrés de glycosylation. L'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs serait dépendante du type de fibre musculaire. Leur fonction précise dans la dégradation du tissu conjonctif est encore inconnue, mais les MMPs sont capables de dégrader les fibres de collagène (Balcerzak *et al.*, 2001). Etant donné que le collagène ne subit que peu de changements durant la maturation, les MMPs ont été peu étudiées. Les MMPs et leurs inhibiteurs auraient un rôle dans l'apoptose (pour revue de Guillemain *et al.*, 2009).

- **Peptidase à sérine**

Elles forment un grand groupe d'enzymes protéolytiques dont les plus connues sont les peptidases digestives (trypsine, chymotrypsine) et les thrombines, plasmines (Sentandreu *et al.*, 2002). La présence des peptidases à sérine a été rapportée dans les muscles squelettiques. Elles auraient un rôle dans la régulation du métabolisme et de l'homéostasie des cellules musculaires. Des peptidases à sérine sont présentes également dans la matrice extracellulaire. Les inhibiteurs de peptidases à sérine forment une famille complexe dont la plus importante

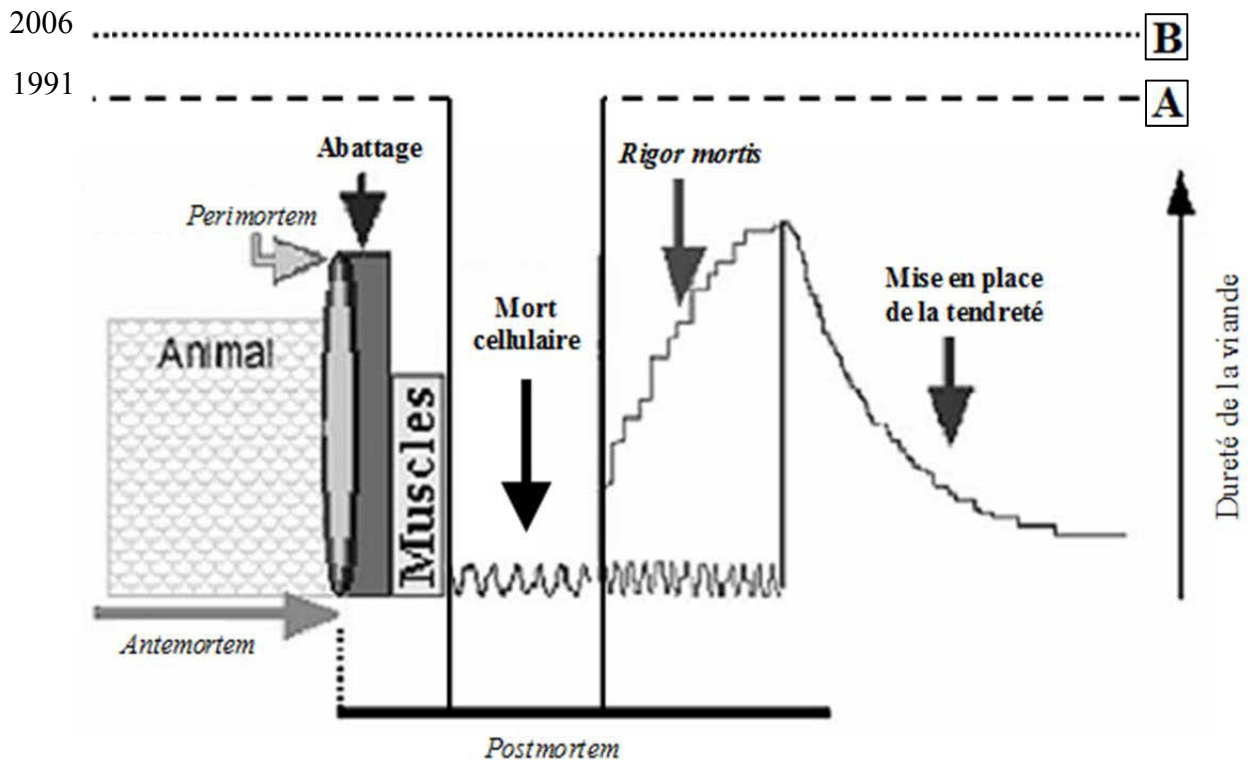


Figure 8. Les différentes phases de l'évolution de la dureté du muscle au cours du temps après l'abattage

A. Vision en 1991

L'impact de la mort cellulaire dans la mise en place de la tendreté n'est pas encore évoqué.

B. Vision en 2006

L'étape précoce de la mort cellulaire a un rôle prépondérant dans la mise en place de la tendreté alors que les systèmes protéolytiques connus ne sont pas encore initiés.

Adapté de Ouali A. (1991 et 2006)

est la famille des serpinines (Péré Brissaud, 2012). Cette famille comprend la plus grande famille des inhibiteurs de protéase identifiés à ce jour, ayant plus de 3000 membres (Olson and Gettins, 2011). Les serpinines régulent des mécanismes comme la coagulation, l'apoptose et l'inflammation.

En conclusion, les protéases jouent ainsi un rôle critique dans l'établissement de la tendreté. La première étape de l'attendrissage de la viande serait due à la μ -Calpaïne dont l'activité diminue avec la chute du pH. Les Cathepsines dont l'activité est optimale à pH acide prennent alors le relais pour hydrolyser les protéines myofibrillaires. D'autres protéases endogènes sont aussi impliquées dans l'attendrissage de la viande soit par une hydrolyse directe des protéines myofibrillaires, soit par la régulation des processus biochimiques associés. Parmi ces protéases se trouvent les protéasomes, les matrice métallopeptidases et les peptidases à serine (Kemp et al., 2010 ; Ouali et al., 2006) . Cependant les activités protéolytiques et fonctionnelles de ces enzymes dans le muscle post-mortem ne sont pas clairement caractérisées. D'une manière générale, l'efficacité d'action de ces systèmes protéolytiques constitue un bon indice de la mise en place de la tendreté (rapidité, amplitude). Plus précisément, c'est le rapport enzyme / inhibiteur qui est déterminant pour la protéolyse lors de la maturation.

V.5. Apoptose et tendreté de la viande : Une nouvelle hypothèse

Les travaux de Ouali *et al.* (2006) ont conduit à une hypothèse selon laquelle il existerait une étape très précoce dans la transformation du muscle en viande. Pendant cette étape, survenant avant la phase de *rigor mortis*, **l'apoptose** (mécanisme physiologique de mort cellulaire programmée) aurait un rôle prépondérant (Figure 8). Lors de l'abattage, l'exsanguination de la carcasse prive les cellules de nutriments et d'oxygène. Les cellules s'engagent alors dans la voie physiologique de mort cellulaire programmée (pour revue de (Taylor *et al.*, 2008) qui permet d'éliminer les cellules endommagées ou dangereuses pour les autres cellules. Ce processus comprenant deux voies d'initiation majeures est très conservé depuis les organismes monocellulaires jusqu'aux mammifères.

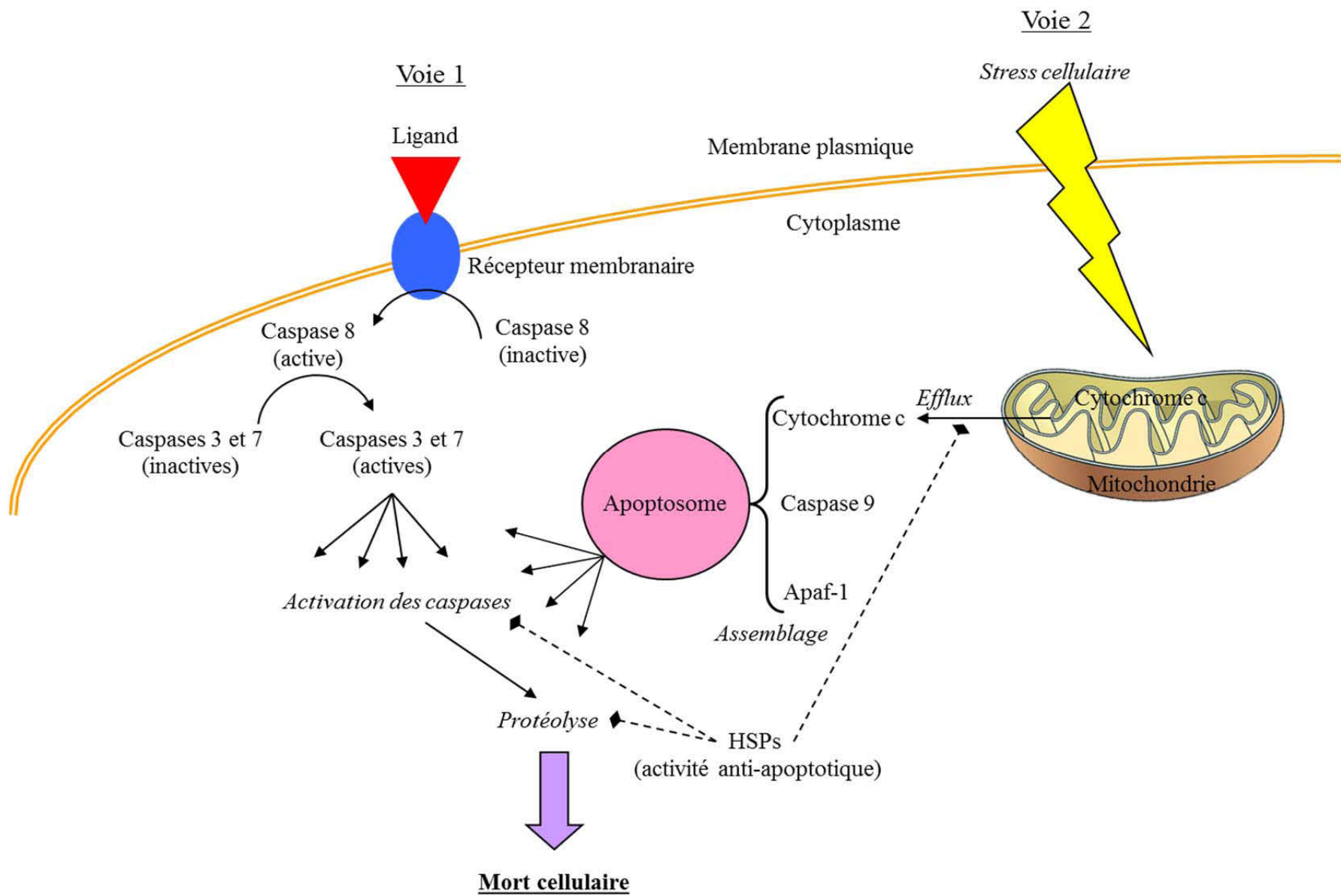


Figure 9. Voies d'activation de l'apoptose par les Caspases

Dans la première voie (Figure 9), le stimulus est externe à la cellule et correspond à l'activation d'un récepteur de mort cellulaire par un ligand activateur, comme la $TNF\alpha$, qui va initier l'activation des Caspases (Concannon *et al.*, 2003).

Dans la deuxième voie, l'évènement activateur est la rupture de la membrane mitochondriale. Cela permet le largage du cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c forme avec d'autres protéines (Apaf-1, Caspase9) un complexe nommé « apoptosome », qui va activer des Caspases.

Selon la théorie de Ouali *et al.* (2006), les premières protéases actives lors de l'abattage seraient les Caspases dont la fonction première est de cliver les protéines cellulaires *in vivo*. Les Caspases constituent un groupe de protéases à Cystéine. Elles sont capables de cliver des protéines après un résidu d'acide aspartique (Sentandreu *et al.*, 2002). Leurs substrats dans la cellule seraient nombreux (de l'ordre de centaines de protéines différentes dégradées), ce qui est comparable à ce qui a été trouvé pour les Calpaïnes. Les Caspases pourraient donc dégrader des protéines clés dans l'organisation structurale des myofibrilles comme la Desmine et vimentine (Chen *et al.*, 2003), conjointement avec d'autres protéases. Elles joueraient un rôle de premier plan dans la mise en place précoce de la tendreté, avant les Calpaïnes. Becila *et al.* (2010) ont mené des études sur des muscles de rat (*Gastrocnemius* et *Plantaris*). Leurs études montrent un rétrécissement des cellules musculaires et une dégradation de l'Actine observés très rapidement en début de période *post-mortem* probablement dû à l'activation des Caspases. Le rétrécissement des cellules musculaires a été également observé et confirmé par Ouali *et al.* (2007) dans le muscle *Longissimus thoracis*.

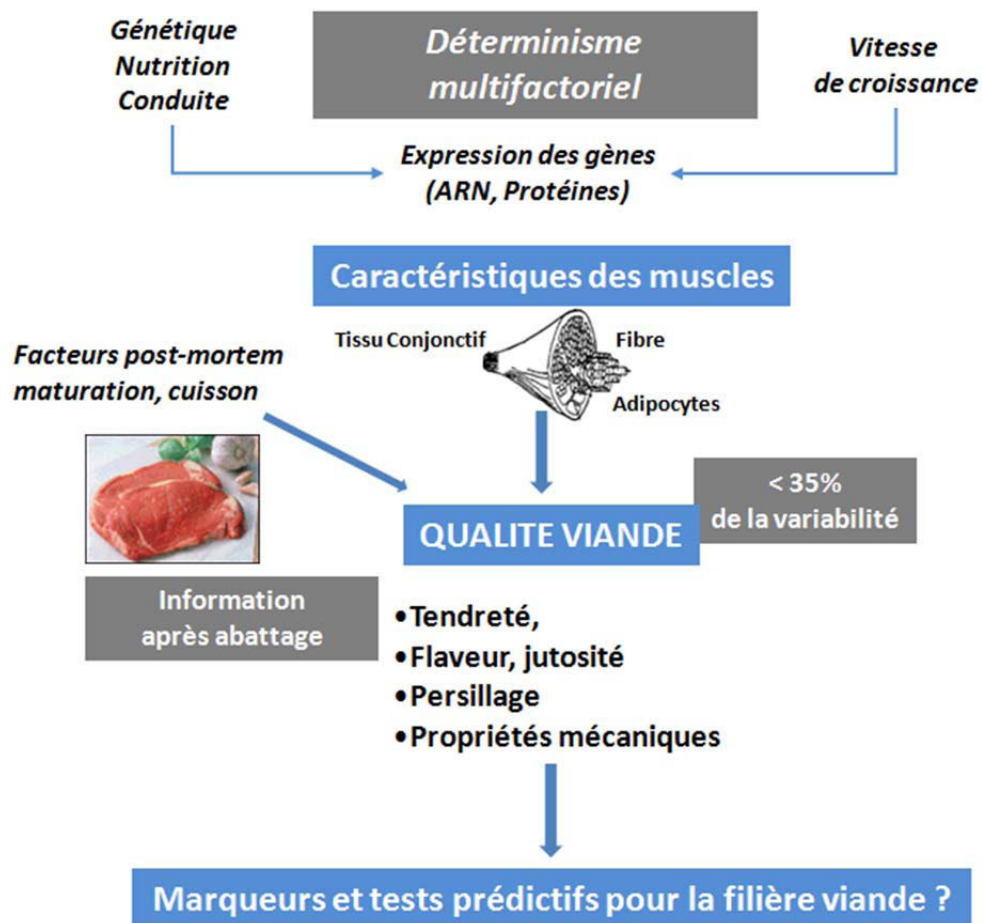


Figure 10. La qualité sensorielle de viande bovine, une fonction complexe de production, de transformation et de préparation de la viande

Une combinaison d'événements dans le muscle, à la fois chez l'animal vivant et durant la période *post-mortem*, contribue à la qualité de la viande. Aujourd'hui, l'information sur la tendreté n'est disponible qu'après l'abattage, idéalement après une maturation optimale (14-21 jours). Les caractéristiques musculaires analysées à ce jour expliquent moins de 35% de la variabilité de la tendreté. Un objectif des recherches est identifier des marqueurs de qualité et concevoir des tests de diagnostic pour la filière viande.

Issu de Cassar-Malek 2012

Au cours de ce chapitre, nous avons vu que la viande est le produit de la transformation post-mortem du muscle. Les changements opérés sont cruciaux pour l'acquisition des qualités de viande notamment de la tendreté.

L'ensemble des études sur la tendreté de la viande bovine confirme son origine multifactorielle complexe (Figure 10). La tendreté dépend en effet de facteurs intrinsèques au muscle, tels que la nature des fibres et du collagène, le taux de lipides intra musculaires et du rapport protéases/inhibiteurs qui dépendent d'une part, du type d'animal (âge, race, sexe) et d'autre part de sa conduite (alimentation et courbe de croissance). Elle va dépendre également des conditions d'abattage et de maturation de la viande (Got et al., 1999) et de facteurs technologiques appliqués lors de la transformation du muscle en viande à l'abattoir (refroidissement des carcasses) qui vont jouer durant la phase de maturation. Ces facteurs n'ont pas été traités ici.

La maîtrise de la tendreté, aujourd'hui très variable, passe par une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans l'élaboration de cette qualité. Elle nécessite aussi de disposer d'indicateurs fiables pour détecter ou prédire le potentiel de qualité des viandes d'animaux. Depuis une quinzaine d'années des travaux de génétique et de génomique fonctionnelle sont conduits à l'INRA notamment par l'équipe Amuvi afin d'identifier des biomarqueurs de tendreté. A terme, ces biomarqueurs seront utilisés pour la mise au point de méthodes d'estimation de la tendreté sur l'animal vivant ou la carcasse.

Chapitre II : Les marqueurs biologiques de la tendreté

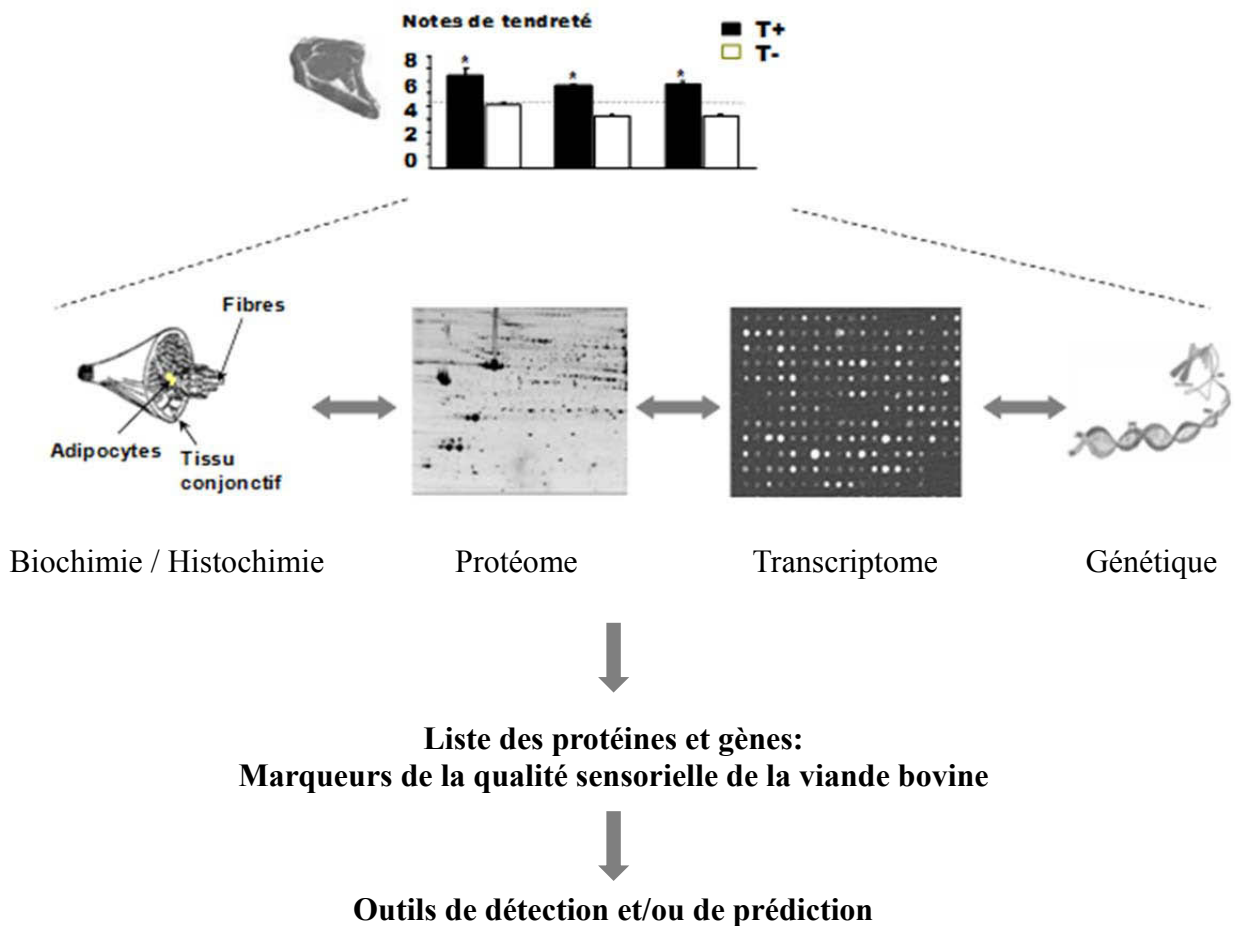


Figure 11. Stratégie utilisée à l'Inra pour identifier des marqueurs de tendreté de la viande bovine

Une combinaison de techniques de biochimie, histochimie et de techniques mises en place à partir des années 2000, permet de révéler des transcrits et protéines susceptibles d'être des candidats pour être des marqueurs de qualité. La pertinence de ces marqueurs doit être ensuite validée.

Adapté de Picard et al, 2010

I. Identification de nouveaux marqueurs biologiques dans la tendreté

Comme vu précédemment, un des objectifs de recherches sur la viande est de prédire la qualité de la viande, en particulier du vivant des animaux. Ceci sous-entend d'identifier des marqueurs afin de détecter les animaux susceptibles de fournir une viande de qualité élevée et constante.

Pour cela, de nouvelles techniques ont été utilisées afin de mettre à profit l'analyse de plus en plus complète des génomes des animaux d'élevage. En effet, les progrès de la biologie moléculaire autorisent l'analyse de plus en plus exhaustive du polymorphisme et de l'expression des gènes dans le muscle des animaux avant et après abattage (Cassar-Malek *et al.*, 2008 ; Hocquette *et al.*, 2005a). L'utilisation de la génomique fonctionnelle, permettant une recherche sans *a priori* de marqueurs biologiques de la tendreté sur des centaines, voire des milliers de gènes ou de protéines, a permis d'établir une liste de candidats marqueurs potentiels de la tendreté. Un marqueur biologique peut être défini de façon générale comme étant une molécule associée à un phénotype particulier, et qui peut être aisément utilisée afin de caractériser ce dernier. L'intérêt d'identifier des marqueurs est de les utiliser dans des outils de détection d'animaux ayant un bon potentiel de qualité. C'est ce que l'équipe Amuvi met en œuvre dans différents projets visant à concevoir des outils utilisables sur le terrain.

I.1. Les apports de la génomique

La stratégie des analyses de génomique fonctionnelle a consisté à comparer les signatures moléculaires (Transcriptomique, Protéomique) dans des groupes d'échantillons musculaires à l'origine de viande de faible (T-) et de haut niveau de tendreté (T+) constitués à partir de mesures sensorielles et/ou instrumentales de la tendreté (Bernard *et al.*, 2007 ; Bouley *et al.*, 2004 ; Chaze *et al.*, 2009b ; Hocquette *et al.*, 2007a) (Figure 11). Les biomarqueurs identifiés sur la base de leur expression différentielle, représentent diverses fonctions biologiques impliquées dans la structure, la contraction et le métabolisme musculaire ou encore le stress oxydant et l'apoptose (pour revue de (Picard, 2012; Picard *et al.*, 2010 ; Picard *et al.*, 2011).

I.1.1. Protéines de structure

Plusieurs protéines de structure telles que l'Actine- α , la myosin binding protein H (MyBP-H), et la CapZ β présentent des différences d'abondance entre des lots de tendreté extrêmes. Par exemple, l'abondance de l'Actine- α a été trouvée corrélée positivement avec la tendreté dans

les trois principales races à viande française Charolaise, Limousine et Blonde d'Aquitaine (Chaze *et al.*, 2009a). Au cours de la maturation de la viande, cette protéine subit des modifications dues à son clivage par les systèmes protéolytiques. Dans une étude de Jia *et al.* (2006) une diminution *post-mortem* de la cofiline a été détectée au sein des deux muscles ST et LT. Cette protéine impliquée dans la polymérisation de l'Actine, chute plus rapidement dans le muscle ST moins tendre.

I.1.2. Protéines contractiles et métaboliques

L'ensemble des résultats obtenus en comparant deux lots de tendreté (élevée ou faible) (Bouley, 2004; Chaze *et al.*, 2009a; Hocquette *et al.*, 2007b) montre, pour le muscle *Longissimus thoracis* (entrecôte), que des protéines représentatives du type rapide glycolytique sont plus abondantes dans les viandes les plus dures. C'est le cas de la phosphoglucomutase (PGM), de la lactate déshydrogénase-B (LDH-B), de la triphosphate isomérase en races Charolaise et Salers, de la glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase (GAPDH) en race Limousine, des isoformes de Troponine T rapide (TnTr) en races Charolaise et Blonde d'Aquitaine, et de la β -enolase en races Limousine et Blonde d'Aquitaine. D'autres enzymes du métabolisme glycolytique ont été identifiées comme de bons prédictors de la tendreté : la glycéraldéhyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH), la phosphoglycerate kinase (Jia *et al.*, 2006), la phosphopyruvate hydratase (Choi *et al.*, 2010 ; Laville *et al.*, 2009), la pyruvate kinase (Laville *et al.*, 2009 ; Polati *et al.*, 2012). L'aldéhyde dehydrogenase impliquée dans la conversion directe du glycéraldéhyde en 2-phosphoglycerate, augmente en période *post-mortem* (Jia *et al.*, 2006). L'isoforme MyHC IIX (rapide glycolytique) a été révélée plus abondante dans les LT les plus durs dans plusieurs études (Picard *et al.*, 2012).

Au contraire, les protéines caractéristiques du type lent oxydatif sont plus abondantes dans les muscles LT les plus tendres. Morzel *et al.* (2008) identifient la succinate déshydrogénase (SDH, enzyme du métabolisme oxydatif) comme le meilleur prédicteur de la tendreté. D'autres résultats au niveau des transcrits, ont mené à des conclusions semblables sur le rapport entre le métabolisme oxydatif et la tendreté dans le muscle LT. Par exemple les enzymes oxydatives suivantes ont été proposées comme marqueurs de tendreté : la beta-hydroxyacyl CoA-dehydrogenase (HADH), le cytochrome c, la succinylCo-A synthase, l'isocitrate deshydrogénase (pour revue (Ouali *et al.*, 2013).

I.1.3. Protéines du métabolisme du calcium

Plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme du calcium ont été identifiées comme marqueurs positifs de la tendreté. La glycoprotéine du réticulum sarcoplasmique 53 kDa (SR53G) est associée au cycle du calcium, et la modification de son expression pourrait être liée à la contraction musculaire et à l'activité des protéases calcium dépendantes. D'autre part, la parvalbumine (PV), impliquée dans le cycle du calcium, est corrélée positivement à la tendreté de la viande dans des races à viandes (Charolaise et Limousine) (Bouley *et al.*, 2004). Cette protéine possède des propriétés structurales lui conférant une forte affinité pour les ions calcium particulièrement dans des fibres rapides entre le cytoplasme et le réticulum sarcoplasmique (Guth and Samaha, 1969). L'abondance de La myosin light chain 2 (MLC2), possédant un site de fixation du calcium, est corrélée négativement avec la tendreté (Bouley *et al.*, 2004). Dans le lot de tendreté supérieure, on détecte une augmentation de la forme phosphorylée de la protéine MLC2 à forte affinité pour le calcium et une diminution de la forme non phosphorylée. Les protéines du cycle du calcium semblent donc fortement impliquées dans la tendreté de la viande, cela est à relier au rôle important du calcium dans la maturation (Ouali, 1992).

Plusieurs membres de la famille des annexines, les annexines A1 et A6 ont été rapportées comme impliquées dans la tendreté. L'abondance de ces protéines impliquées dans la régulation du calcium, est fortement modifiée en phase *post-mortem* (Zhao *et al.*, 2012), (Bjarnadottir *et al.*, 2012).

I.1.4. Protéines de stress thermique (Hsps)

Un ensemble de protéines de la famille des protéines de choc thermique (Heat Shock, Hsp) a été révélé comme marqueur de la tendreté au niveau du transcrit ou de la protéine dans différentes expérimentations. L'étude de Bernard *et al.* (2007) a montré en particulier une corrélation négative entre l'expression du gène DNAJA1 et la tendreté. Ce gène code pour une protéine chaperonne de la famille des Hsps appelée Hsp40. Cette protéine intervient dans l'import des protéines dans la mitochondrie et inhibe le mécanisme d'apoptose en interaction avec une autre protéine chaperonne, la Hsp70. L'activité anti-apoptotique de cette dernière pourrait ralentir le processus de mort cellulaire durant les premières phases de la maturation

en accord avec la théorie de Ouali *et al.* (2006). Dans le cadre du programme ANR² (MUGENE Genanimal – APIS-GENE), des analyses transcriptomiques ont permis de mettre en évidence d'autres gènes codant pour des Hsps plus exprimés dans les viandes dures, parmi lesquels Dnaja1, Dnaja11 et HspB1. Les niveaux d'expression d'autres gènes codant les protéines sont positivement corrélés à la force de cisaillement (Bernard *et al.*, 2007 ; Hocquette *et al.*, 2012). Un groupe de 4 transcrits de Hsp (HspB1, Dnaja1, HspH1 et HspA8 permet d'expliquer 44% de la variabilité de la tendreté chez des bovins du même dispositif (Hocquette *et al.*, 2012). D'autre part, Capetanaki *et al.* (2007) ont montré que le gène Cryab est sous exprimé dans les muscles de bovins produisant une viande de tendreté supérieure. Ce gène code pour l' α B-crystalline qui joue un rôle important dans la protection des filaments myofibrillaires en prévenant leur agrégation. La sous-expression de cette protéine accélérerait la dégradation des filaments myofibrillaires, et par conséquent augmenterait la tendreté (Guillemin *et al.*, 2009). Au niveau protéique, plusieurs travaux ont identifié les protéines Hsp27 et α B-crystalline comme marqueurs de tendreté (Bouley *et al.*, 2004 ; Herrera-Mendez *et al.*, 2006 ; Morzel *et al.*, 2008). Dans le muscle *Semitenidosus* (ST), l'abondance des Hsps est corrélée à la mesure de Warner-Bratzler (WB), le groupe des Hsp20s présentant une corrélation négative avec la mesure de WB au contraire des Hsp70s.

I.1.5. Protéines de protection contre le stress oxydant

Des protéines comme la superoxyde dismutase (Sod1), la peroxyredoxine 6 (Prdx6) ou encore Park7 (Dj1) intervenant dans le stress oxydant ont été révélées comme marqueurs de tendreté dans plusieurs études (pour revue de Picard *et al.*, 2012). Chez les bœufs, la Sod1 est corrélée positivement avec la mesure de WB (+0,43) au niveau du ST.

En suivant une approche descriptive basée sur l'établissement de classes de tendreté effectuées à partir des notes de tendreté globale, Guillemin *et al.* (2012) ont pu générer les premières équations fiables de prédiction de la tendreté sur un système d'élevage français. Certaines protéines comme Prdx6 et Hsp27 représentent des paramètres importants dans ces équations. Ces résultats ont montré l'importance du stress oxydant, par la validation de Prdx6 et son implication dans la tendreté à la fois dans les muscles ST et LT. D'autre part, différents

² Agence nationale de la recherche

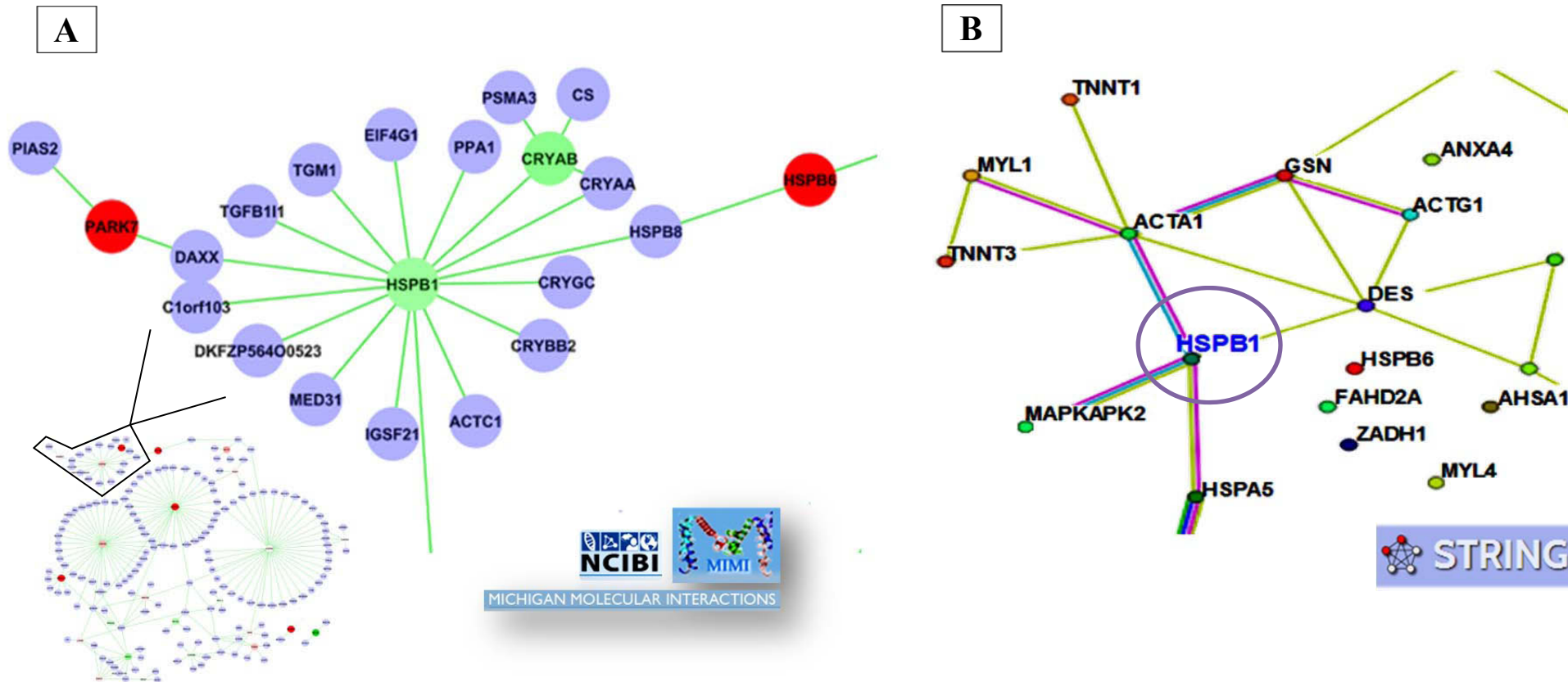


Figure 12. Interactomes musculaires construits à partir de 24 marqueurs protéiques de tendreté

A. Interactome musculaire de tendreté du muscle *Longissimus thoracis* « Base de donnée MIMI » (Guillemin et al., 2011)

Détail d'un sous-réseau centré sur HspB1 (Hsp27)

B. Interactome des interactions protéine – protéine « Base de donnée STRING »

Les entités représentent les protéines, et les arrêtes les relations entre les protéines.

STRING: Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (<http://string-db.org>)

MIMI: Michigan Molecular interactions (<http://www.eecs.umich.edu/db/mimi>)

travaux ont permis de valider la Hsp27 comme marqueur négatif de tendreté (Bernard *et al.*, 2007 ; Hwang *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2008).

I.2. Intégration des données de génomique

Afin d'apporter une meilleure compréhension sur les marqueurs de tendreté et leurs interactions, et d'approfondir l'analyse des fonctions biologiques jouant un rôle dans l'élaboration de la tendreté, une première analyse bio-informatique a permis de construire un réseau biologique à partir de 24 protéines marqueurs de la tendreté de la viande bovine (Guillemin *et al.*, 2011a). Dans cet interactome (Figure 12), les auteurs ont établi le lien entre 330 protéines qui pourraient influencer directement ou indirectement la tendreté de la viande.

La figure 12 montre plusieurs sous réseaux, en particulier quatre de taille importante articulés autour des protéines : Capn1, Hspa1a, Hspa8 et **Hsp27**. Deux autres sous-réseaux correspondant au métabolisme énergétique et à la structure du muscle, peuvent être distingués. L'analyse fonctionnelle du sous-réseau centré autour de Hsp27 révèle principalement des fonctions impliquées dans la régulation de l'apoptose (37 %), du transport intracellulaire (14 %), de la régulation initial de la traduction (14 %) et de la voie de signalisation des récepteurs aux androgènes (14 %). Trois protéines H2afx, Sumo4 and Tp53 se situent également à des positions d'intersections des différents sous-réseaux en particulier correspondant au métabolisme, la structure et le stress, indiquant qu'elles pourraient jouer un rôle dans l'établissement de la tendreté.

La comparaison des interactomes établis pour les deux muscles ST et LT, fait apparaître des points communs entre les deux muscles mais aussi des spécificités. En particulier les fonctions cellulaires correspondant à la résistance au stress oxydant, à la protéolyse *via* μ -Calpaïnes et à l'intégrité des costamères apparaissent communes aux deux muscles. En revanche, l'implication des fonctions liées à la protéolyse liée à m-Calpaïnes, aux activités des protéines de la famille des Hsp70, au métabolisme énergétique et au type contractile de fibres (MyHC) apparaît spécifique du muscle (Guillemin *et al.*, 2011b).

L'ensemble des travaux sur la recherche de marqueurs de la tendreté de la viande a mis en évidence que la tendreté résulterait aussi de mécanismes cellulaires, tels que l'apoptose et la protection contre le stress oxydant. Un grand nombre de protéines de stress, en particulier plusieurs membres de la famille des Hsps, ont été révélés comme marqueurs de tendreté. En plus d'être des marqueurs, les transcrits de gènes ou de protéines identifiés ont sans doute un rôle biologique dans le déterminisme de la tendreté. Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces protéines et leurs fonctions afin de progresser dans la compréhension des processus d'élaboration de la tendreté.

Chapitre III : Les Protéines de choc thermique (Hsps)

I. Des protéines de réponse au stress cellulaire

Les protéines de choc thermique (Heat Shock protéines, Hsps) ont été décrites comme une classe de protéines subissant une modification de leur niveau d'expression en réponse à différents changements de l'environnement générant un stress cellulaire : choc thermique, carences nutritives, infections virales, agents chimiques divers (Kampinga *et al.*, 2009). Cette réponse est qualifiée d'universelle car elle est présente chez les bactéries, les végétaux et les eucaryotes supérieurs.

Les gènes de Hsps sont exprimés de façon basale dans les cellules en conditions normales, mais sont exprimés à des niveaux plus élevés lorsqu'elles sont exposées à un saut brusque de température ou à d'autres formes de stress (pH, pression osmotique ...). Les Hsps représentent ainsi l'un des systèmes génétiques le plus hautement conservé entre les organismes. Par exemple, le gène Hspa1a (codant la Hsp70-1a) présente un pourcentage d'identité de 72 % entre l'Homme et la drosophile et de 50% entre l'Homme et *Escherichia coli* (Hunt and Morimoto, 1985).

Les protéines de choc thermique sont des « chaperones moléculaires ». La plupart des inducteurs de stress ont en commun d'altérer les structures des protéines cellulaires perturbant ainsi le métabolisme cellulaire et entraînant une toxicité. Les Hsps sont capables de s'associer avec ces protéines et d'empêcher leur agrégation. Elles peuvent également redonner aux protéines nouvellement formées ou anormales, une conformation tridimensionnelle adéquate (Burel *et al.*, 1992). Cette fonction de « chaperonne moléculaire » confère aux Hsps un rôle essentiel dans la protection lors d'un stress mais aussi dans le métabolisme cellulaire en dehors de tout stress. L'exposition d'une cellule à un choc thermique induit trois étapes successives. La première étape, dite d'altération, conduit à la dénaturation des protéines ayant pour conséquence la perte de leur fonction et la formation d'agrégats protéiques insolubles (Nguyen *et al.*, 1989). La seconde étape, la réponse au choc thermique, se caractérise par l'activation transcriptionnelle des gènes Hsp aboutissant à la synthèse des protéines Hsps. Enfin, durant la phase de récupération au cours de laquelle les altérations morphologiques sont corrigées, les protéines retrouvent des activités similaires à leurs activités initiales. Ainsi, l'activation des gènes Hsp est interrompue et les Hsps retrouvent leur niveau basal d'expression.

Tableau 1. Les familles de protéines de choc thermique chez les mammifères

Famille	Membres	Poids moléculaire
Hsp110	Hsp105/Hsp110	De 100 à 110 kDa
Hsp90	Hsp90 α /Hsp90 β Grp94/Trap1	De 83 à 90 kDa
Hsp70	Hsp73/Hsc70-t Hsp70.1/Hsp70.2/Hsp70.3 Grp75/Grp78	De 66 à 78 kDa
Hsp60	Hsp60	60 kDa
Hsp47	Hsp47	47 kDa
sHsp	HspB1/HspB2 HspB3/HspB4 HspB5/HspB6 HspB7/HspB8 HspB9/HspB10	De 12 à 43 kDa

Tableau de classification des différentes familles des protéines de choc thermique selon le poids moléculaire.

Hsp : Heat shock proteins = protéines de choc thermique

sHsp : Small heat shock proteins = petite protéines de choc thermique

kDa : Kilodalton

Adapté de Gibert, 2010

II. Familles de Hsps

Chez les mammifères, les Hsp sont regroupées en six familles principales en fonction de leur poids moléculaire – Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp47 (grandes Hsp) et la famille des Hsp20 (petites protéines de stress : small Hsps – sHsps) (Tableau 1). En dépit de leurs propriétés communes, chaque famille présente des particularités liées à leur mécanisme d'action, leur localisation intracellulaire, leur dépendance à l'ATP comme substrat énergétique ou la nature inductible de leur expression. Ainsi, les gènes de la famille Hsp60 « chaperonnes mitochondriales » sont exprimés constitutivement, alors que ceux de Hsp70 et Hsp27 sont fortement induits lors d'un stress. La transcription des gènes codant pour les Hsps est activée par une famille de facteurs de transcription, les Heat Shock Factors (Hsfs) qui reconnaissent des séquences spécifiques, présentes dans le promoteur d'un gène Hsp, les heat shock elements (Hse). Dans des conditions physiologiques normales, les Hsf sont constitutivement liés à certaines Hsps ubiquistes. Lors d'un stress, la liaison entre les Hsps et les Hsf est déstabilisée. Les Hsf. Leur trimérisation puis leur phosphorylation permet leur migration dans le noyau et leur liaison aux Hse. Parmi les membres de cette famille, Hsf1 est le plus étudié (Fiorenza *et al.*, 1995). L'inactivation d'Hsf1 entraîne une perte de la thermotolérance chez la souris (McMillan *et al.*, 1998).

Dans la suite de ce chapitre, je vais présenter brièvement les familles des Hsp90, Hsp70 et Hsp40 puis je me focaliserai sur la famille des petites protéines de stress (small Hsps). Ce sont les familles les plus connues parmi les familles de protéines de choc thermique.

II.1. La famille Hsp90

Les protéines de choc thermique appartenant à la famille Hsp90 figurent parmi les plus exprimées. Cette famille est composée de quatre membres principaux : Hsp90 α , Hsp90 β , Grp96 et Traf1 (Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Protein 1).

Les deux isoformes Hsp90 α et β sont les plus étudiées. Ce sont les Hsp constitutives les plus abondantes dans les cellules de mammifères qui peuvent représenter jusqu'à 2% des protéines solubles (Kampinga *et al.*, 2009). Ces deux isoformes possèdent trois domaines distincts : la partie N-terminale correspondant au domaine de liaison à l'ATP, le domaine central formant la zone de liaison aux polypeptides cibles, enfin le domaine C-terminal nécessaire pour la dimérisation de la protéine (Figure 13). Cette dimérisation est par exemple nécessaire pour la translocation dans le noyau après un choc thermique (Prodromou *et al.*, 2000).

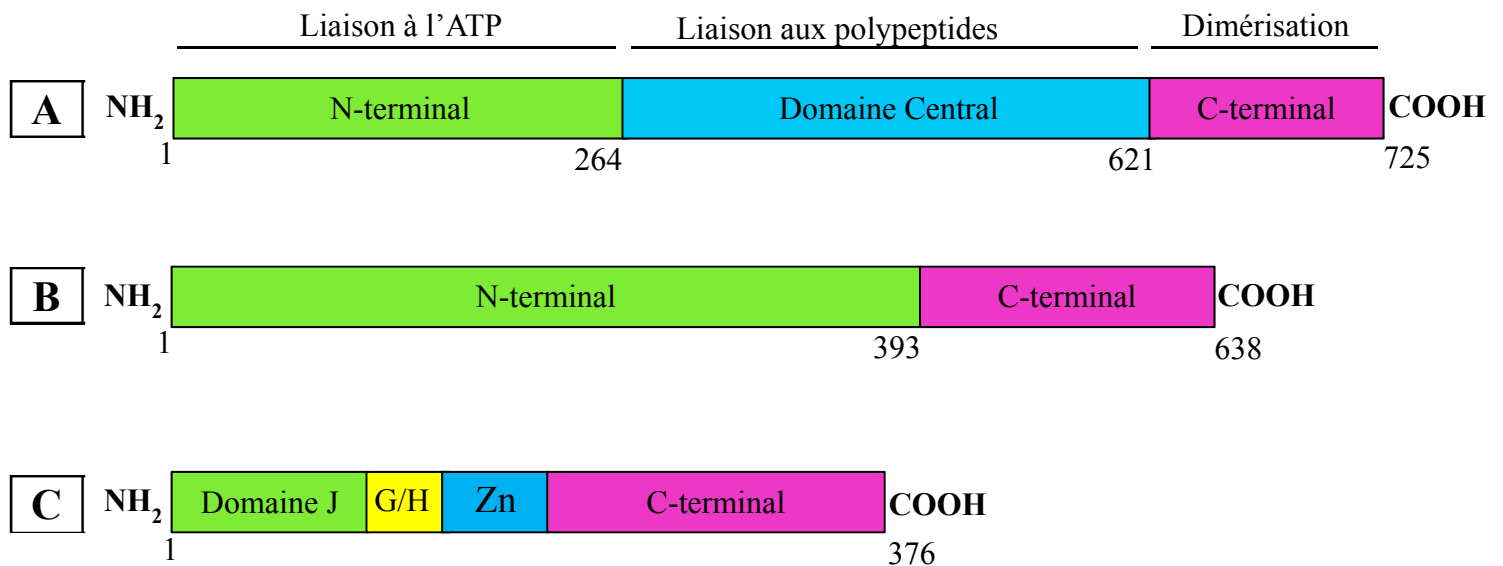


Figure 13. Comparaison schématique de la structure des protéines Hsp90, Hsp70 et Hsp40

Les boîtes représentent les domaines fonctionnels

A. Structure générale de la protéine Hsp90

B. Structure générale de la protéine Hsp70

Les deux domaines fonctionnels sont représentés :

Le domaine N-terminal, hautement conservé à activité ATPase

Le domaine C-terminal, moins conservé liant des peptides cibles

C. Structure générale de la protéine Hsp40

Cette protéine est caractérisée par la présence du domaine J dans la région N-terminale qui est séparé du reste de la protéine par la région G/F riche en glycine-phénylalanine. Elle comporte aussi une séquence riche en cystéines « Domaine en doigt de zinc » et un domaine C-terminal.

Hsp90 possède la capacité de se lier de manière stable avec des protéines essentielles dans les voies de transduction des signaux, des facteurs de transcription et des protéines du cycle cellulaire. Elle a la faculté de protéger de nombreuses protéines contre une dégradation par le protéasome et a permis de faire émerger le concept de « protéines clientes ». En effet, en s'associant avec une cible elle permet sa stabilisation et sa non dégradation ce qui augmente ainsi sa demi-vie (Whitesell and Lindquist, 2005).

La Hsp Gp96 (Glycoprotein 96) de 96 kDa aussi appelée GRP94 est abondante au sein du reticulum endoplasmique, grâce à une séquence de rétention c-terminale (Maki *et al.*, 1990). On la retrouve également exprimée à la surface cellulaire (Robert *et al.*, 1999). GP96 est une chaperonne moléculaire impliquée dans la maturation des protéines (Yang and Li, 2005). Récemment, de nombreuses études tendent à lui attribuer un rôle dans le système immunitaire. En effet, Gp96 participait à la présentation des antigènes, et activerait les réponses immunitaires.

Trafl est une protéine dont l'activité dépend de l'ATP, située dans la mitochondrie. Elle semble avoir des fonctions antioxydantes et antiapoptotiques (Gesualdi *et al.*, 2007).

II.2. La famille Hsp70

Les Hsps de 70 kDa représentent les Hsps les plus étudiées, les plus abondantes et les plus conservées. Cette famille comprend différents membres présentant un haut degré d'identité de séquence, entre eux ainsi que d'un organisme à l'autre (50% de similarité entre le gène humain Hsp70 et son homologue DnaK chez *E.coli*, et plus de 70% avec celui de la drosophile) (Kampinga *et al.*, 2009). La famille Hsp70 est représentée au minimum par cinq protéines hautement conservées: Hsp70, Hsc70, Grp75 et Grp78 chez les mammifères (Tableau 1), certaines étant exprimées constitutivement alors que d'autres sont strictement inductibles. Les Hsp70 inductibles sont les plus importantes pour le maintien de l'intégrité des cellules pendant la croissance normale ainsi que les conditions physiopathologiques (Gao *et al.*, 2010). Les membres de la famille Hsp70 jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des protéines cellulaires en agissant comme des polypeptides de liaison qui interagissent avec les régions non natifs des protéines à différents stades de leur cycle de vie (Fan *et al.*, 2003). Tous possèdent une structure commune (Figure 13) qui contient deux domaines : une extrémité N-terminale hautement conservée à activité ATPase et une extrémité C-terminale moins conservée liant des peptides. Les protéines de la famille Hsp70 partagent également la fonction de chaperonne moléculaire, liant transitoirement des protéines immatures ou

dénaturées afin d'éviter que ces dernières n'inter-agissent de manière inappropriée et évitent alors une mauvaise conformation, une agrégation ou une perte de fonction. Elles peuvent lier, par leur extrémité carboxy-terminale, des segments courts et linéaires de peptides ou de protéines non repliés (Feige & Polla, 1994). Cette fonction s'opère dans un cycle utilisant l'ATP : les polypeptides interagissent transitoirement avec le domaine de liaison aux peptides de Hsp70, ce qui stimule l'hydrolyse de l'ATP et induit un changement conformationnel des Hsp70, augmentant leur affinité pour les peptides. Ensuite, le peptide lié est relâché lors de l'échange de l'ADP avec un nouvel ATP (McCarty *et al.*, 1995). Ces interactions sont observées transitoirement 15 à 30 minutes après la synthèse d'une nouvelle protéine.

Certains membres ont un rôle dans le développement des spermatozoïdes comme Hsp70.2 qui semble jouer un rôle essentiel dans la progression en méiose des cellules germinales mâles (Dix *et al.*, 1997). Les protéines Grp75 et Grp78 sont présentes respectivement dans les mitochondries et la lumière du réticulum endoplasmique où elles participeraient à la translocation et au repliement des polypeptides dans les différentes organites, de manière ATPasique (Kudo *et al.*, 2007).

Les isoformes de Hsp70 (Hsp70.1, Hsp70.2 et Hsp70.3) sont fréquemment surexprimées dans les cellules cancéreuses, qu'elles protègent de la mort induite par de nombreux agents anticancéreux, en particulier grâce à leur capacité à prévenir l'apoptose (Garrido *et al.*, 2006). Leur expression dans les cancers est associée à un haut degré de malignité et à un faible pronostic (Mosser and Morimoto, 2004). Hsp70, comme la Hsp90 joue également un rôle dans les processus de différenciation (Lanneau *et al.*, 2007).

II.3. La famille Hsp40 (Dnaj)

La famille Dnaj (Hsp40) est probablement la plus grande famille des protéines de choc thermique. Cette famille est caractérisée par la présence d'un domaine J (Figure 13) de « 70 acides aminés » conservé depuis les bactéries jusqu'aux mammifères (Kampinga *et al.*, 2009). Ce domaine J interagit avec les protéines de la famille des Hsp70. Les Dnaj jouent un rôle dans la régulation de l'activité ATPasique des Hsp70. Ce sont des chaperonnes moléculaires qui protègent les protéines des agrégations au cours de la synthèse et/ou suite à un stress cellulaire. On trouve les Hsp40 en grande quantité dans le *reticulum endoplasmique*. L'expression de certains membres de cette famille est simultanée à la synthèse de tous les types de collagènes. En effet, elles seraient essentielle lors de la maturation des pro-collagènes en collagène actif (Makareeva and Leikin, 2007).

II.4. La famille des petites protéines de stress (small Hsps)

Les protéines de choc thermique de faible masse moléculaire (small Hsps, sHsps) sont les plus variables en taille ayant une masse moléculaire variant de 12 à 43 kDa. Chez les mammifères, dix sHsps ont été identifiées, les plus étudiées étant les Hsp20, 27 et l' α B-crystalline (Taylor and Benjamin, 2005). Ces trois Hsps sont génétiquement très conservées.

Elles sont présentes dans tous les organismes vivants (Kampinga *et al.*, 2009). La famille des sHsps présente la plus grande hétérogénéité de structure parmi les différentes classes de Hsps, ce qui est illustré par une plus faible homologie de séquence entre les membres de cette famille (Kappe *et al.*, 2002). Elles sont cependant caractérisées par la présence d'une séquence commune d'une centaine d'acides aminés appelée domaine α -crystalline (Baranova *et al.*, 2011). Il s'agit d'une séquence initialement observée dans les protéines du cristallin de l'œil des mammifères. Les sHsps sont capables de s'oligomériser pour former de larges complexes, dont le poids moléculaire peut atteindre 800 kDa. De plus, elles sont fortement sujettes à une modification post-traductionnelle, la phosphorylation, qui régule leur capacité à s'oligomériser, et ainsi, leur fonction biologique (Bruey *et al.*, 2000). Les sHsps contribuent à la résistance au choc thermique ainsi qu'à de nombreux autres stress, notamment à l'administration des agents anticancéreux, jouant ainsi un rôle fondamental dans la survie cellulaire (Garrido *et al.*, 1998). Elles remplissent aussi la fonction de chaperonne moléculaire, tout comme les autres classes de Hsp. Les sHsps peuvent lier les protéines non natives avec une haute affinité et les maintenir dans un état précis pour le repliement. D'autres Hsps interviennent afin d'assister le repliement. Contrairement aux autres Hsps, les sHsps agissent sans recours direct à l'hydrolyse d'ATP.

III. Cas particulier de Hsp27

Hsp27 est présente constitutivement dans de nombreuses lignées cellulaires et dans une grande variété de tissus. Toutefois, son niveau d'expression basale est relativement faible, et présente une grande variabilité selon le type cellulaire (Huang *et al.*, 2007). C'est l'une des Hsps les plus induites en réponse à un stress cellulaire, elle peut alors atteindre 1 % de la quantité totale des protéines cellulaires, et s'accumule selon une cinétique plus lente que celle d'Hsp70, ce qui fait d'elle une Hsp dite « tardive » (Garrido *et al.*, 2006).

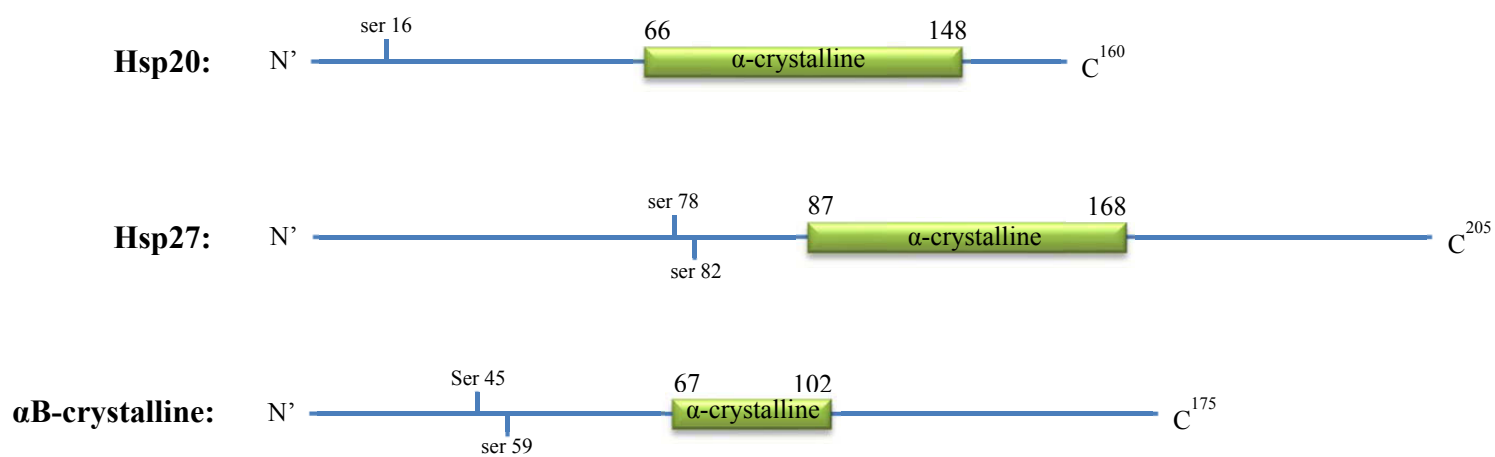


Figure 14. Comparaison schématique de la structure des protéines Hsp20, Hsp27 et αB-crystalline

III.1. Caractérisation et structure

Hsp27 est une protéine de 205 acides aminés. Comme toutes les sHsps, elle comporte un domaine α B-crystallin de 81 acides aminés en position C-terminale, qui lui confère la fonction d'oligomérisation (Figure 14). Comme les autres membres de la famille des sHsps, elle est active sous la forme de complexes dont la taille varie de 50 à 800 kDa. Il arrive qu'Hsp27 forme des hétérooligomères plus ou moins stables avec d'autres sHsps, telles que l' α B-crystalline et la Hsp22. Dans des conditions physiologiques stables, Hsp27 a une distribution cytoplasmique, comme le montrent des observations de microscopie électronique et des expériences de fractionnement cellulaire (Rogalla *et al.*, 1999). Elle semble cependant être majoritairement concentrée dans la région périnucléaire (Garrido *et al.*, 2006).

III.2. Fonctions cellulaires

La protéine Hsp27 est impliquée dans les processus de développement et de différenciation cellulaire. Elle assure aussi d'autres fonctions essentielles au maintien de l'intégrité et à la survie cellulaire.

III.2.1. Rôle de chaperonne moléculaire

Hsp27, en agissant de façon coordonnée avec les autres Hsps, facilite indirectement la réparation des protéines endommagées suite à un stress. Son efficacité en tant que chaperonne moléculaire réside dans sa faculté de s'oligomériser, ce qui lui permet de lier un grand nombre de protéines dénaturées, et donc de prévenir la toxicité due à la formation d'agrégats protéiques (Rogalla *et al.*, 1999). L'augmentation de l'expression des Hsps lors d'un stress est souvent associée à une diminution de la quantité globale de protéines et à une chute de la production d'ARN messager (Didomenico *et al.*, 1992). Il a été montré qu'Hsp27 pouvait inhiber *in vitro* la synthèse protéique après un choc thermique, en s'associant avec le facteur Eif4G (Elongation initiation factor 4G) qui est essentiel au processus de traduction (Cuesta *et al.*, 2000).

III.2.2. Inhibition de l'apoptose

Plusieurs travaux ont montré la capacité des Hsps à contrôler certaines des étapes de la cascade d'activation des Caspases menant à la mort cellulaire par apoptose (Didelot *et al.*, 2006 ; Garrido *et al.*, 2001 ; Samali *et al.*, 2001). Hsp27 protège les cellules de la mort induite par l'exposition à des agents tels que la staurosporine, l'actinomycine D, le Tnf α (Tumor necrosis factor α), l'étoposide (Garrido *et al.*, 2001 ; Samali *et al.*, 2001). Une autre étude suggère qu'Hsp27 n'agit pas sur la formation de l'apoptosome, mais empêche l'activation protéolytique de la procaspase 3 par la Caspase 9. Le mode d'action de Hsp27 sur la voie apoptotique reste controversé puisque des résultats contradictoires montrent que l' α B-cristalline peut interagir avec le cytochrome-c, mais pas Hsp27 (Kamradt *et al.*, 2002). Hsp27 inhibe l'apoptose induite par la liaison de Fas Ligand (FasL) à son récepteur (Mehlen *et al.*, 1996). Hsp27 peut également s'associer à la protéine Daxx, un médiateur de l'apoptose. L'apoptose induite par Daxx est indépendante des Caspases. Hsp27 bloque également la mort cellulaire par sa fonction antioxydante. Elle est en effet capable de réduire le taux des espèces oxygénées réactives (ou ROS, Reactive oxygen species) et de neutraliser les effets toxiques des protéines oxydées suite à un stress oxydant (Arrigo *et al.*, 2005).

III.2.3. Protection du cytosquelette

Hsp27 est reconnue pour exercer une activité protectrice du cytosquelette, et plus précisément des microfilaments d'Actine (During *et al.*, 2007). Plusieurs études ont montré que la surexpression d'Hsp27 en conditions de stress telles que l'hyperthermie ou l'exposition à des agents oxydants, conduit à la stabilisation des filaments de F-Actine, et donc à la protection de l'architecture cellulaire (Huot *et al.*, 1997). Le rôle d'Hsp27 sur la dynamique de l'Actine repose sur son degré de phosphorylation (addition de groupe phosphate). Il s'agit de l'un des mécanismes de régulation le plus important et le plus fréquent. La phosphorylation est catalysée par diverses protéines kinases spécifiques, alors que les phosphatases se chargent de déphosphoryler. La phosphorylation de la Hsp27 s'effectue au niveau de 3 sites sérines : la sérine 15, la sérine 78 et la sérine 82, qui lui permet de former des structures oligomériques, est stimulée dans plusieurs types cellulaires en réponse à différents agents (ex: le choc thermique, le facteur nécrosant tumoral, ...). La protéine Hsp27 est aussi phosphorylée par la MPK2 (Mapkap Kinase 2). Cet état de phosphorylation fait que la protéine se présente dans les cellules sous plusieurs isoformes. L'Hsp27 sous forme de petites oligomères s'associe

avec la α -Actine, pour la stabiliser et prévenir la désagrégation des microfilaments, vraisemblablement en empêchant l'interaction avec des protéines susceptibles de compromettre leur stabilité. Hsp27 intervient également sous forme non phosphorylée et monomérique au niveau de l'Actine libre en la coiffant pour inhiber sa polymérisation (Mounier and Arrigo, 2002). En interaction avec l' α B-crystalline, Hsp27 est impliquée dans l'organisation et la protection des structures myofibrillaires, et localisée au niveau des structures sarcomériques telles que les stries Z et I. La Hsp27 agit en interaction avec d'autres partenaires, en particulier la Hsp70 pour protéger les protéines myofibrillaires (Desmine, Actine, Myosine et la Titine).

IV. sHsps et qualité de la viande

Le rôle possible des sHsps dans la maturation de la viande a été initialement présenté par Ouali *et al.* (2006). Il suppose l'engagement des cellules musculaires dans une phase d'apoptose *post mortem* alors que les cellules sont dépourvues d'oxygène. En réponse, les gènes des sHsps sont exprimés afin d'empêcher l'apparition de la mort cellulaire et protéger les protéines musculaires, dans le but de maintenir l'homéostasie cellulaire. La protection des protéines musculaires par les sHsps retarde la maturation de la viande en atténuant la dégradation des protéines myofibrillaires (Tableau 2).

IV.1. sHsps et dégradation des protéines myofibrillaires au cours de la maturation

Les sHsps sont abondantes et dynamiquement exprimées dans le muscle après l'abattage (Jia *et al.*, 2007 ; Jia *et al.*, 2006 ; Pulford *et al.*, 2008). Elles régulent la polymérisation de l'Actine, l'interaction Actine-Myosine, et sont impliquées dans l'assemblage des filaments intermédiaires du muscle (Mounier and Arrigo, 2002). De plus, elles empêchent l'agrégation des protéines pendant les périodes de stress (Kampinga *et al.*, 2009). Une importante quantité de Hsp27, protège l'Actine de la dégradation chez l'animal vivant. Hsp27 joue un rôle dans la prévention de l'agrégation protéique et favoriserait ainsi l'accès des protéases à leurs cibles. Les données de Morzel *et al.* (2008) montrent que la quantité de protéines dégradées au cours de la maturation augmente pour l'Actine, la créatine kinase, l' α B-crystalline et la Hsp27.

Le rôle constitutif des sHsps dans l'assemblage des filaments musculaires et la stabilisation des composantes myofibrillaires pendant les périodes de stress les impliquent dans le développement et l'installation de la tendreté de la viande bovine. Les études protéomiques sur les biomarqueurs de la qualité de la viande ont toujours révélées une expression variable de sHsps entre des lots extrêmes de tendreté (Picard, 2012). Cependant, la relation entre l'expression *post-mortem* des sHsps et la tendreté de la viande n'est pas encore claire. Une corrélation positive et significative a été montrée entre l'abondance de Hsp27 et la dureté de la viande chez le bovin (Kim *et al.*, 2008) et le porc (Hwang *et al.*, 2005). Grâce à leur fonction chaperonne, une régulation négative de Hsp27 et α B-crystalline a été suggérée au vu leur implication dans le maintien de l'intégrité des protéines (Bernard *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2008). D'autre part, Morzel *et al.* (2008) ont montré une relation négative et significative entre l'abondance de Hsp27 et la dureté de la viande. L'abondance de Hsp27 et Hsp20 sont significativement plus élevées au niveau du muscle *Longissimus thoracis* des taurillons que dans le muscle *Semitendinosus* (Guillemin *et al.*, 2011b), sachant que la viande du muscle *Longissimus thoracis* est considérée comme plus tendre que celle du muscle *Semitendinosus*. L'agrégation des protéines qui se produit au cours de la maturation de la viande peut provoquer des changements chimique et physique des sites de reconnaissance des protéines myofibrillaires et diminuer par la suite leur sensibilité à la protéolyse (Morzel *et al.*, 2006). Des concentrations élevées des sHsps dans le muscle *Longissimus thoracis* pourraient éviter la formation des agrégats protéiques facilitant ainsi la dégradation protéolytique des protéines myofibrillaires et conduisant à une meilleure tendreté de la viande (Guillemin *et al.*, 2011a ; Morzel *et al.*, 2008).

Les études de la cinétique de l'abondance de Hsp20, Hsp27 et α B-crystalline au niveau du *Longissimus thoracis* au cours de la maturation ont montré une diminution de l'expression des sHsps dans les 2 jours *post-mortem*. Toutefois, cette baisse est liée au pH_u . Un pH_u élevé est suivi d'un niveau élevé de sHsps (Lomiwes *et al.*, 2012). La chute rapide des sHsps avec la diminution du niveau du pH est probablement due à la précipitation de ces protéines suite à la diminution du pH musculaire (valeur inférieure au point isoélectrique des protéines myofibrillaires) (Pulford *et al.*, 2008). Avec un pH_u élevé les petites chaperonnes ont été progressivement dégradées au cours de la maturation due probablement aux μ -Calpaïnes ayant une activité optimale à pH_u élevé (Lomiwes *et al.*, 2013).

Tableau 2. Les petites chaperonnes et la tendreté de la viande

Tendreté de la viande et expression des petites chaperonnes	Références
1. L'abondance de la Hsp27 est corrélée significativement avec la force de cisaillement.	Hwang <i>et al.</i> , 2005
2. Les abondances des transcrits Hsp27 et α B-crystalline sont corrélées négativement avec la tendreté mesurée par analyse sensorielle.	Bernard <i>et al.</i> , 2007
3. L'abondance de la Hsp27 dans le muscle post-mortem explique jusqu'à 89 % de la tendreté globale de jeunes bovins charolais.	Morzel <i>et al.</i> , 2008
4. L'expression de la Hsp27 est plus élevée dans les viandes dures.	Kim <i>et al.</i> , 2008
5. L'abondance de α B-crystalline est plus élevée dans la viande à pH _u intermédiaire.	Pulford <i>et al.</i> , 2009
6. Hsp27 est présente dans un nœud de l'interactome de tendreté.	Guillemin <i>et al.</i> , 2011
7. Hsp27 appartient à un groupe de 4 protéines qui permettent d'expliquer 44% de la variabilité de la tendreté chez des bovins charolais.	Hocquette <i>et al.</i> , 2012

Une étude complémentaire a montré que l' α B-crystalline est d'autant plus associée aux myofibrilles squelettiques que le pH musculaire diminue (passant de 7,4 à 6,5), ceci suggère que la disparition des sHsps est due à l'association de ces derniers aux myofibrilles squelettiques suite à la diminution du pH_u.

Ainsi, les sHsps protègent l'intégrité structurale des muscles de deux manières :

- en se liant aux myofibrilles musculaires et stabilisent les protéines en préservant ainsi la structure des muscles,
- en devenant des substrats pour la μ -Calpaïne et réduisant ainsi l'hydrolyse des protéines myofibrillaires.

IV.2. sHsps et autres qualités de la viande

Au-delà de la tendreté de la viande, l'analyse protéomique a révélé une forte association entre l'expression des sHsps et les indices de couleurs (L*a*b). L'abondance de Hsp27 et de l' α B-crystalline est plus élevée dans les muscles de couleur foncée chez le bovin (Kim *et al.*, 2008) et le porc (Sayd *et al.*, 2006). Cette relation a été confirmée dans une autre étude, où l'expression de α B-crystalline et Hsp27, étaient négativement corrélées à l'indice de luminosité L (Hwang *et al.*, 2005). L'effet de pH_u sur la couleur de la viande est bien connu. Généralement il y a une corrélation négative entre l'indice de luminosité et le pH_u de la viande chez le bovin (Page *et al.*, 2001) et le porc (Dransfield *et al.*, 1985). Ainsi, la couleur foncée de la viande est associée à une valeur élevée du pH_u de la viande. Ceci pourrait être lié à une activité importante des mitochondries dans les viandes à pH_u élevé qui maintient la myoglobine dans son état désoxymyoglobine sombre plutôt que son état oxymyoglobine (rouge cerise) (Tang *et al.*, 2005).

L'expression de sHsps a été également liée à d'autres qualités de la viande. Une perte importante à l'égouttage au niveau du muscle *Longissimus thoracis* du porc a été associée à une faible concentration de Hsp27 et α B-crystalline. A l'inverse, (Kwasiborski *et al.*, 2008) rapportent une corrélation positive entre Hsp27 et α B-crystalline et la perte à la cuisson. D'autre part, l'étude de Bernard *et al.* (2007) montre qu'une diminution de la concentration de Hsp27 et α B-crystalline est associée à une augmentation de la jutosité et la flaveur du muscle *Longissimus thoracis* de taurillons charolais.

L'utilisation de la génomique dans le domaine de la viande a révélé une association significative entre l'expression des sHsps et surtout la Hsp27 et la qualité de la viande. Compte-tenu de l'abondance de ces protéines dans les tissus musculaires, de leur fonction anti-apoptotique et de chaperonne, leur rôle est certainement au-delà d'être de simples indicateurs de la qualité de la viande. A l'heure actuelle, les connaissances sur les sHsps sont limitées à des mesures quantitatives. Les mécanismes d'actions de ces derniers dans la qualité de la viande sont encore inconnus.

Objectifs du travail de thèse

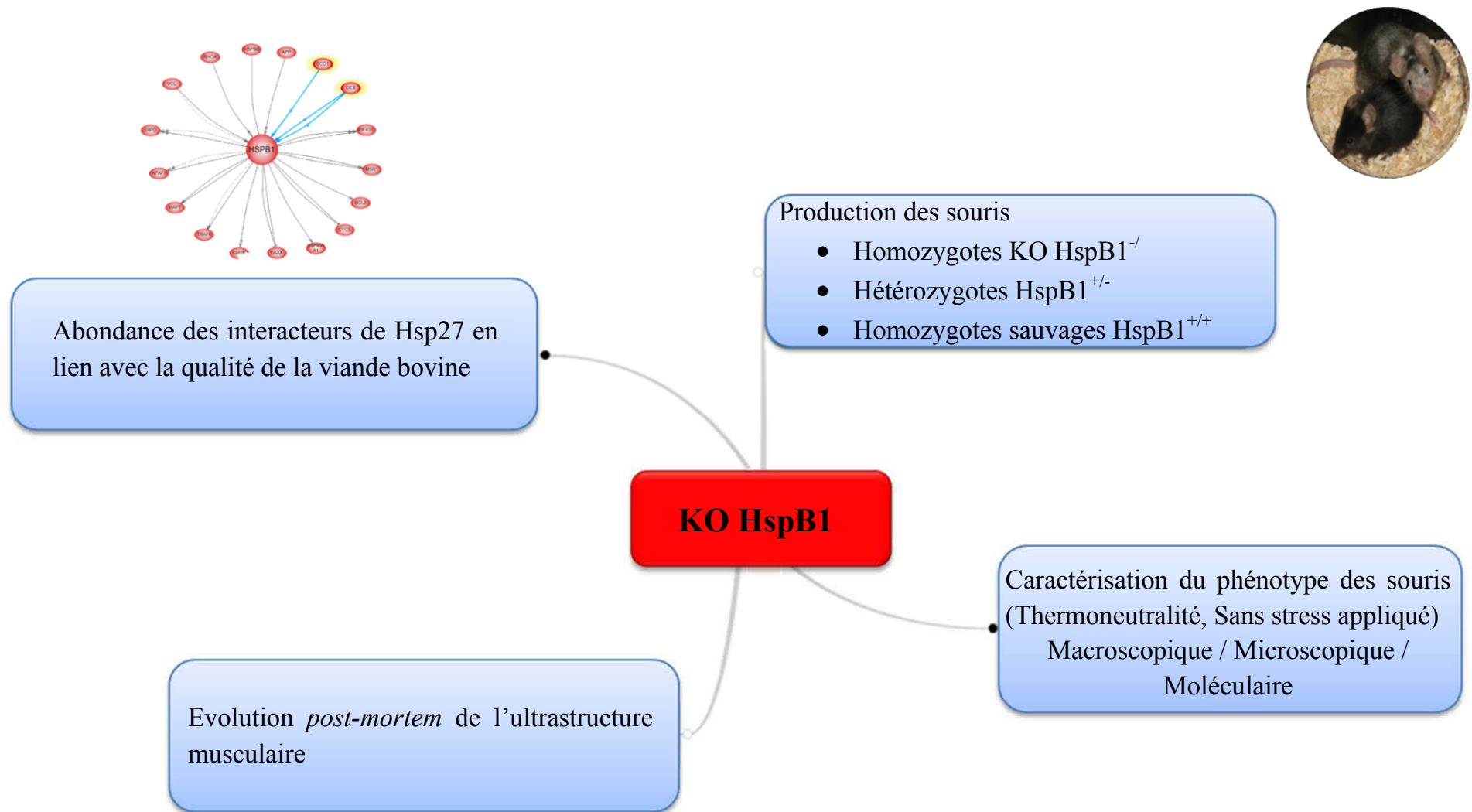


Figure 15. Stratégie suivie au cours de la thèse

Les données bibliographiques présentées ci-dessus soulignent que la tendreté de la viande bovine reste encore l'une des qualités sensorielles la plus complexe et la plus difficile à maîtriser. Cette dernière est multifactorielle et dépend à la fois de facteurs extra- et intrinsèques. L'évolution des techniques et des recherches sur la qualité de la viande ont permis d'identifier des profils d'expression protéiques différents dans des lots de tendreté extrême. Ainsi des marqueurs de tendreté ont été identifiés et validés sur un grand nombre d'animaux. Dans cette liste, la Hsp27 a été identifiée comme étant différentiellement exprimée entre des muscles de tendreté extrême. Il apparaît donc nécessaire d'acquérir de nouvelles connaissances sur les mécanismes d'action de ces marqueurs et surtout la Hsp27 pour mieux comprendre la mise en place de cette qualité et caractériser les phénomènes biologiques mis en jeu.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était d'analyser les conséquences de l'inactivation du gène HspB1 (codant la protéine Hsp27) chez une espèce modèle la souris, d'une part sur le développement et les caractéristiques des tissus liés à la qualité, et d'autre part sur les autres acteurs de la tendreté. Ceci devrait permettre de dégager de nouvelles hypothèses à valider chez le bovin.

Ma thèse s'est articulée en quatre étapes successives (Figure 15) :

- L'établissement d'une lignée de souris KO HspB1
Cette étape a été réalisée au Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris à Lyon et à l'Installation Expérimentale de Nutrition à Theix.
- Le phénotypage des souris KO HspB1
Plusieurs approches ont été suivies pour étudier les conséquences du KO HspB1 sur le phénotype des souris (Suivi des paramètres physiologique et analyses tissulaires).
- L'identification des interacteurs de la Hsp27 en lien avec la qualité de la viande chez le bovin et la détermination de leur abondance chez les KO HspB1 vs témoins. Cette analyse fonctionnelle couplait deux approches différentes : l'une prédictive (la bio-informatique) et l'autre sans a priori (la protéomique comparative).
- L'étude de l'évolution *post-mortem* de l'ultrastructure musculaire.

Résultats

Article I : Kammoun et al.
publié dans
« European Journal of Histochemistry »

Article I: A simplified immunohistochemical classification of skeletal muscle fibres in mouse.

Kammoun M. Cassar-Malek I. Meunier B. Picard B.

Introduction

La classification des fibres musculaires repose sur un critère fonctionnel (la vitesse de croissance) et un critère métabolique (le métabolisme énergétique) correspondant respectivement à la vitesse d'utilisation de l'énergie au cours de la contraction et à la source principale d'énergie. La plupart des classifications décrivent au moins trois principaux types de fibres dans le muscle squelettique adulte des mammifères (Jurie and Listrat, 2010) révélés par des techniques histologiques. L'évolution des connaissances sur les isoformes de chaînes lourdes de Myosine (MyHC) a permis une progression dans la classification des fibres en utilisant des techniques différentes (Hu *et al.*, 2012). Une des premières classifications est basée sur la sensibilité au pH acide ou alcalin de l'activité ATPasique (ATP : adénosine triphosphite) des MyHC. Ainsi, une distinction entre les fibres de type I, à contraction lente acido-sensible, et les fibres de type II, à contraction rapide acido-résistante, a été possible (Guth and Samaha, 1970). Par la suite, en utilisant différents pH de pré-incubation, Brooke et Kaiser (1970) ont complété cette classification en identifiant trois principaux types de fibres : I, IIA et IIX. Avec la progression de la technique d'immunologie, des anticorps poly et monoclonaux anti-MyHC ont été produits. Ainsi, à partir de la révélation des isoformes de MyHC : I, Ila, IIX et IIb en immunohistologie, quatre types de fibres I, IIA, IIX et IIB peuvent être mis en évidence. L'utilisation d'anticorps anti-MyHC permet aussi de distinguer des fibres appelées « hybrides » qui contiennent simultanément plusieurs isoformes de MyHC. Cependant, la technique d'immunohistologie est généralement longue et laborieuse pour le phénotypage des muscles y compris pour des effectifs modérés d'animaux. Récemment, Meunier *et al.* (2010) ont développé un algorithme d'analyse d'images pour réaliser un typage rapide des fibres et une caractérisation morphométrique des muscles de bovin.

L'objectif de la présente étude était d'adapter cette méthode pour la classification des types de fibres musculaires chez la souris. Cette approche originale d'analyse d'image n'était pas encore utilisée chez la souris a été mise en œuvre au début de la thèse. Elle devait me permettre de réaliser le phénotypage des souris du dispositif expérimental de thèse.

Résumé

La classification des fibres musculaires est très intéressante pour étudier les propriétés musculaires en particulier dans un objectif de phénotypage animal. Il est donc important de pouvoir utiliser une méthode rapide et fiable pour la classification des fibres musculaires. Pour cela, nous avons d'abord testé une combinaison de plusieurs anticorps anti-chaînes lourdes de Myosine afin de choisir un nombre minimum d'anticorps. Ensuite, nous avons comparé cette classification aux résultats de l'électrophorèse de chaînes lourdes de la Myosine sur les mêmes échantillons. Une combinaison de deux anticorps est nécessaire pour classer les fibres des muscles *Tibialis anterior* (BF-F3 / SC71) et *Soleus* (BA-D5 / SC71) des souris. Les résultats obtenus ont été validés par électrophorèse suivi d'une analyse d'image. Ainsi, nous proposons ici une méthode utile, rapide et efficace pour la classification immunohistochimique des fibres musculaires chez la souris.

A simplified immunohistochemical classification of skeletal muscle fibres in mouse

M. Kammoun,^{1,2} I. Cassar-Malek,^{1,2}

B. Meunier,^{1,2} B. Picard^{1,2}

¹INRA, UMR 1213 Herbivores, F-63122

Saint-Genès-Champagnelle, France

²Clermont University, VetAgro Sup, UMR

1213 Herbivores, Clermont-Ferrand,

France

Abstract

The classification of muscle fibres is of particular interest for the study of the skeletal muscle properties in a wide range of scientific fields, especially animal phenotyping. It is therefore important to define a reliable method for classifying fibre types. The aim of this study was to establish a simplified method for the immunohistochemical classification of fibres in mouse. To carry it out, we first tested a combination of several anti myosin heavy chain (MyHC) antibodies in order to choose a minimum number of antibodies to implement a semi-automatic classification. Then, we compared the classification of fibres to the MyHC electrophoretic pattern on the same samples. Only two anti MyHC antibodies on serial sections with the fluorescent labeling of the Laminin were necessary to classify properly fibre types in *Tibialis Anterior* and *Soleus* mouse muscles in normal physiological conditions. This classification was virtually identical to the classification realized by the electrophoretic separation of MyHC. This immunohistochemical classification can be applied to the total area of *Tibialis Anterior* and *Soleus* mouse muscles. Thus, we provide here a useful, simple and time-efficient method for immunohistochemical classification of fibres, applicable for research in mouse.

Introduction

Skeletal muscle fibres are classified according to their contractile and metabolic properties. The contractile properties depend on the composition in myosin heavy chain isoform (MyHC) (for a review see Schiaffino and Reggiani).¹ MyHC encoded by a multigene family² is the major component of the contractile apparatus combining with actin to form the actomyosin complex which is responsible for the elastic and contractile properties of muscle. Evolution in the knowledge about

MyHC isoforms led to progression in the classification of fibres using different techniques.³ Firstly, the histochemical technique was based on the revelation of the ATPase activity of MyHC and allowed to distinguish between slow and fast muscle fibres. The myosin ATPase activity is higher in fast than in slow muscles and correlates with muscle shortening speed.⁴ Then, the combination of different pH of pre-incubation for the revelation of ATPase activity revealed three types of fibres mainly I, IIA and IIB.^{5,6} The discovery of the activity of oxidative enzymes (e.g., the Succinate dehydrogenase, SDH) helped distinguish oxidative and non oxidative fibres.⁷ A combination of methods to simultaneously detect contractile and metabolic properties can detect slow-oxidative fibres, fast glycolytic and fast oxidative fibres.³ Then, with the progress of immunology, anti MyHC monoclonal antibodies were produced. Their use by immunohistochemistry on serial sections enabled the detection of four types of fibres in rat, mouse, rabbit, pig muscles: I, IIA, IIX (or IID) and IIB.⁸ The development of electrophoretic separation of MyHC according to their molecular weights also revealed the existence of four MyHC in adult rodent muscles.⁹ Moreover, the use of monoclonal antibodies demonstrated that some fibres called hybrid fibres contain several isoforms of MyHC. *In situ* hybridization analysis on single fibre, confirmed that rodent muscles contain a spectrum of fibre types, including hybrid fibres with preferential combinations of MYH transcripts, according to the following sequence: I \hookrightarrow I / IIA \hookrightarrow IIA \hookrightarrow IIA / IIX \hookrightarrow IIX \hookrightarrow IIX / IIB \hookrightarrow IIB.¹⁰

Among the different techniques, immunohistochemistry is the most accurate as it makes it possible to distinguish pure and hybrid fibres. This method has been used for the analysis of skeletal muscle in different species^{3,11,12} for the studies in mice, different antibodies are available.^{13,14} Several hundred of fibres might reasonably be analyzed per biological sample by comparing serial sections using different anti MyHC antibodies. The manual analysis of the different sections is laborious and time consuming, that is why several authors developed semi-automatic image analysis softwares.^{15,16}

The aim of the present study was to adapt the method of Meunier *et al.* for the classification of contractile fibre types in mouse.¹⁶ Our objective was to use a minimum number of antibodies to reduce the number of serial sections to be compared. We first tested a combination of several anti MyHC antibodies. Then, we validated the classification of the fibres obtained by immunohistochemistry through a comparison with the MyHC electrophoretic pattern on the same samples.

Correspondence: Brigitte Picard, INRA, UMR 1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champagnelle, France.

Tel. +33.4.73624056 – Fax: +33.4.73624639. E-mail: brigitte.picard@clermont.inra.fr

Keywords: skeletal muscle, mouse, myosin heavy chain, immunohistochemistry, electrophoresis, image analysis.

Contributions: MK, analytical immunohistochemistry experiments, data interpretation, manuscript drafting; ICM, experiment co-manager, manuscript drafting; BM, image analysis, manuscript drafting; BP, experiment co-manager, myosin and immunohistochemistry studies specialist, manuscript drafting.

Conflict of interests: the authors declare no conflict of interests.

Acknowledgments: we are grateful to the experimental plant for nutrition and microbiology of INRA (Clermont-Ferrand/Theix) for animal management. We also thank Christiane Barboiron for her excellent technical support and advice on immunohistochemistry.

Received for publication: 30 July 2013.

Accepted for publication: 14 April 2014.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 3.0 License (CC BY-NC 3.0).

©Copyright M. Kammoun *et al.*, 2014

Licensee PAGEPress, Italy

European Journal of Histochemistry 2014; 58:2254

doi:10.4081/ejh.2014.2254

Materials and Methods

Animals and experimental procedure

Two muscles known to have a different composition of fibre types were studied, namely the m. *Soleus* (SOL) and m. *Tibialis Anterior* (TA). According to the literature, the SOL is a slow oxidative muscle and the TA a fast glycolytic muscle.^{17,18} Both muscles were dissected from anaesthetized male C57BL6 mice at 12 weeks of age (n=8). Following dissection, they were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis.

Immunohistochemical detection of myosin heavy chains

MyHC antibodies

For contractile fibre type determination, in order to detect slow and fast MyHC isoforms, we chose anti MyHC antibodies according to the data available for mouse skeletal muscle (Table 1). Six antibodies were tested on serial sections. BA-D5 specific for MyHC I, SC71 spe-

cific for MyHC IIa, BF-F3 specific for MyHC IIb,¹⁹ S5-8H2 for MyHC I, IIx and IIb. These antibodies were purchased from AGRO-BIO (La Ferté Saint Aubin, France).²⁰ N2.261, which reveals MyHC I and IIa, and RTD9 labelling MyHC IIx¹⁹ were purchased from Enzo Life Sciences (ELS) (Lyon, France). The reactivity of these antibodies has been validated on mouse muscles.¹⁷

Immunohistochemical revelation

Serial transverse sections (10-µm thick) were obtained from each muscle sample using a cryostat (Cryo-star HM 560, Microm International GmbH, Germany) at -26°C, mounted on glass slides and stained using immunohistochemical methods. The sections were blocked to eliminate non specific binding in 5% BSA diluted in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min. The cross-sections were then incubated with primary antibodies in a humidified chamber for one hour in the dark at 37°C (dilution conditions illustrated in Table 2). After washing in phosphate-buffered saline, the sections were then incubated with the secondary antibodies for 30 min in the dark at 37°C.¹⁶ Each anti MyHC antibody was used double labelling with anti laminin antibody on the same section. The MyHC isoforms were revealed by an Alexa Fluor 488 labeled goat anti-mouse IgG secondary antibody (A11001, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, dilution 1/200). For BF-F3, we used an Alexa Fluor 546 anti-mouse IgM secondary antibody (A11010, Invitrogen ; dilution 1/1000). The cell outline was stained using a rabbit anti-laminin primary polyclonal antibody (L9393 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Table 2) and a goat anti-rabbit IgG Cy3-labeled secondary antibody (111-165-008, Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA, USA, dilution 1/200). After further washing in PBS, sections were mounted with cover slips using Fluoromount (F4680, Sigma-Aldrich). Finally, negative control experiments (section incubated without specific primary antibodies and anti-laminin antibody) were performed with all immunohistochemical staining to demonstrate the non-specific reactivity.

Image acquisition and analysis

Histological sections were visualized under an Olympus fluorescence microscope BX 51, using a 10X objective (NA=0.3) and adequate band pass filter (Alexa 488: excitation filter 460-495, emission filter 510-550, dichromatic mirror 505LP; Cy3: excitation filter 530-550, emission filter 575-625, dichromatic mirror 565LP) as described by Meunier *et al.*¹⁶ High resolution grayscale images were acquired with an Olympus cooled digital camera DP-72 with cell-F software (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany). For each field of each serial section, two images correspon-

Table 1. Summary of the responses of different anti Myosin Heavy Chains (MyHC) antibodies in mouse *Soleus* and *Tibialis Anterior* muscles.

Isoforms	MyHC-I	MyHC-IIa	MyHC-IIx	MyHC-IIb
BA-D5	+	-	-	-
SC-71	-	+	-	-
N2.261	+/-	+	-	-
S5-8H2	+	-	+	+
BF-F3	-	-	-	+
RTD-9	-	-	+	-

According to Duris *et al.*¹¹, and Schiaffino *et al.*²²; -, unlabeled; +/-, intermediate; +, labeled.

ding to the laminin and MyHCs labelling respectively were digitized. Image processing and image analysis were realized with the *FibTypFluo* program developed in visual basic under the Visilog 6.9 Professional Software (Noesis, Gif-sur-Yvette, France).

This program is described in a flow chart¹⁶ and permits to automatically determine the muscle fibre type proportion (%), mean cross-sectional area (CSA) per type and fibre density (number per mm²) for an average 300 fibres per serial image.

Electrophoretic separation of MyHC isoforms

Muscle proteins were extracted with a buffer containing 0.5 M NaCl, 20 mM NaPPi, 50 mM Tris, 1 mM EDTA and 1 mM DTT according to the protocol described by Picard *et al.*²¹ Samples were homogenized with a polytron. Following centrifugation at 2500 x g for 10 min at 4°C, the supernatants were diluted 1:1 (v/v) with glycerol and stored at -20°C. The protein concentration of the samples was determined according to the method of Bradford.²²

The samples were suspended in 1:1 v/v in a basic 2 x Laemmli solution containing 4% w/v sds, 10% v/v β-mercaptoethanol, 20% v/v glycerol, 125 mM Tris (pH 6.8) and 0.01 % w/v pyronin Y, incubated at room temperature for 10 min and then heated (70°C) for 10 min. The MyHC isoforms were separated with SDS glycerol gel electrophoresis on 160 x 160 x 1.5 mm plates using a Hoefer system in accordance with the method of Laemmli.²³ The stacking gel contained 4% polyacrylamide with a cross-link of 1.96 %. The separating gel was an 8 % polyacrylamide gradient with a cross-link of 1%, as described in Mizunoya *et al.*²⁴ A critical factor affecting the resolution of MyHC isoforms was the addition of glycerol to the gel matrix with a final concentration of 35%, according to Sugiura *et al.*²⁵ Three micrograms of protein were loaded per well onto 0.75-mm-thick gels. The electrophoresis was run at a constant voltage of 140V for 15 h at 4°C. After migration, the gels were stained in a solution of Coomassie Blue. Gel images were captured

Table 2. Conditions for each primary antibody used in this study.

Antibody	Dilution
Monoclonal anti-bovine BA-D5	Pure
Monoclonal anti-bovine BF-F3	Pure
Monoclonal anti-bovine S5-8H2	1/2
Monoclonal anti-bovine SC71	Pure
Monoclonal anti-human N2.261	1/50
Monoclonal anti-bovine RTD-9	Pure
Polyclonal anti-human Laminin	1/200

using the Expression 10000XL Pro scanner (Epson) and the percentages of abundance of each MyHC (I, IIa, IIx and IIb) were quantified using ImageQuant TL v7.0 software (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA).

Statistical analysis

Muscle fibre type distribution and cross-sectional areas were expressed as means and standard deviation. Statistical significance of the differences between means for the different combinations of antibodies was assessed by analysis of variance (ANOVA) using the GLM procedure of SAS Software (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA). A Student's *t*-test was performed to compare the fibre type distributions obtained with the immunohistochemical method to those obtained with the electrophoresis method. A probability of less than 5% was considered statistically significant.

Results

Choice of the anti MyHC antibodies

Our first aim was to choose the combination of a minimum number of antibodies to obtain a simple and correct typing result while minimizing cost and time. The choice of antibodies was made from the data available in the literature on antibody specificities for mouse skeletal muscles. Among all possible combinations (5 antibodies=23 combinations of two or more antibodies), only those potentially interesting

according to the literature were tested according to the muscle studied on one individual.

Soleus muscle

Several authors demonstrated at protein²⁶ or transcript level,¹⁷ that SOL did not contain IIB MyHC. We therefore used the BF-F3 antibody which specifically recognizes IIB fibres in mouse,²⁷ on eight SOL samples and confirmed the absence of MyHC IIB isoform in the SOL (Figure 1). Then, four combinations of antibodies were tested on one mouse and compared to the BA-D5/SC71/S5-8H2 combination used as a reference. As observed in Table 3, all the combinations revealed equivalent proportions of MyHC in the SOL, with a low coefficient of variation between the different combinations tested. Among the 4 combinations tested, the BA-D5/SC71 was preferred due to the specificity of these antibodies to recognize a single fibre type (Table 1) facilitating image analysis.

Tibialis Anterior muscle

In the literature, this muscle is said not to contain slow type I fibres. We verified it in the eight samples by using the BA-D5 antibody that is specific for slow MyHC. With this antibody we did not observe any labelling which confirms the absence of type I fibres in the TA (Figure 2). As for the SOL, we tested six different combinations of antibodies (Table 4). All the combinations revealed nearly the same proportions of fibres in the TA. Among the combinations tested, the BF-F3/SC71 combination was chosen because it enables efficient typing of fibres. The pattern of SC71 staining intensities revealed the existence of unlabelled, labelled and intermediary labelled fibres (Figure 2). The intermediary labelled fibres contained less abundance of IIA MyHC than marked fibres, they were IIA-X hybrid fibres. Lastly, no hybrid IIX-B fibres were detected. This was confirmed by using RTD9 as control for MyHC IIX labelling (*data not shown*).

Characterisation of fibres by image analysis

Fibre type composition was determined in 8 mice with the two selected combinations of antibodies using semi-automatic image analysis as described by Meunier *et al.*¹⁶ The mean percentages of each fibre type were in agreement with the data presented in Tables 3 and 4, and with data from the literature.

In the TA, we revealed a predominance of type IIB (57%). A low percentage of hybrid IIA-X fibres (3%) was observed (Table 5). No hybrid IIX/IIB fibres were observed. This result was confirmed using anti RTD9 antibody (*data not shown*). The SOL consisted mainly of type IIA and I fibres (respectively 46% and 43%, Table 5). We did not observe any hybrid fibres

in this muscle. We estimated the total number of fibres on the whole muscle section area in both SOL (muscle area 2 mm²) and TA (muscle area <12 mm²) muscles (Figure 3). In the

TA, 1323 fibres on average (all types combined) were counted *i.e.*, approximately 110 fibres per mm². The SOL was composed of 724 fibres and had a higher density of fibres than

Table 3. Proportions of I, IIA, IIX, and IIB fibres detected with different combinations of antibodies in the *m. Soleus*.

Fibres types	% I	% IIA	% IIX	% IIB
BA-D5/N2.261	37	54	9	0
BA-D5/S5-8H2	40	50	10	0
N2.261/S5-8H2	36	56	8	0
BA-D5/SC71	38	53	9	0
<i>BA-D5/SC71/S5-8H2</i>	<i>40</i>	<i>51</i>	<i>9</i>	<i>0</i>
Mean	38	53	9	0
CV(%)	4	4	8	0

CV, coefficient of variation among serial cross sections; the reference combination is in *italics*.

Table 4. Proportions of I, IIA, IIA-X, IIX, and IIB fibres detected with different combinations of antibodies in the *m. Tibialis Anterior*.

Fibres types	% I	% IIA	% IIA-X	% IIX	% IIB
BF-F3/S5-8H2	0	4	5	35	56
BF-F3/SC71	0	5	4	34	57
BF-F3/N2.261	0	5	4	33	58
S5-8H2/N2.261	0	6	5	32	56
S5-8H2/SC71	0	6	6	32	56
<i>BF-F3/SC71/S5-8H2</i>	<i>0</i>	<i>5</i>	<i>4</i>	<i>34</i>	<i>57</i>
Mean	0	5	5	33	57
CV (%)	0	19	15	3	2

CV, coefficient of variation among serial cross sections; the reference combination is in *italics*.

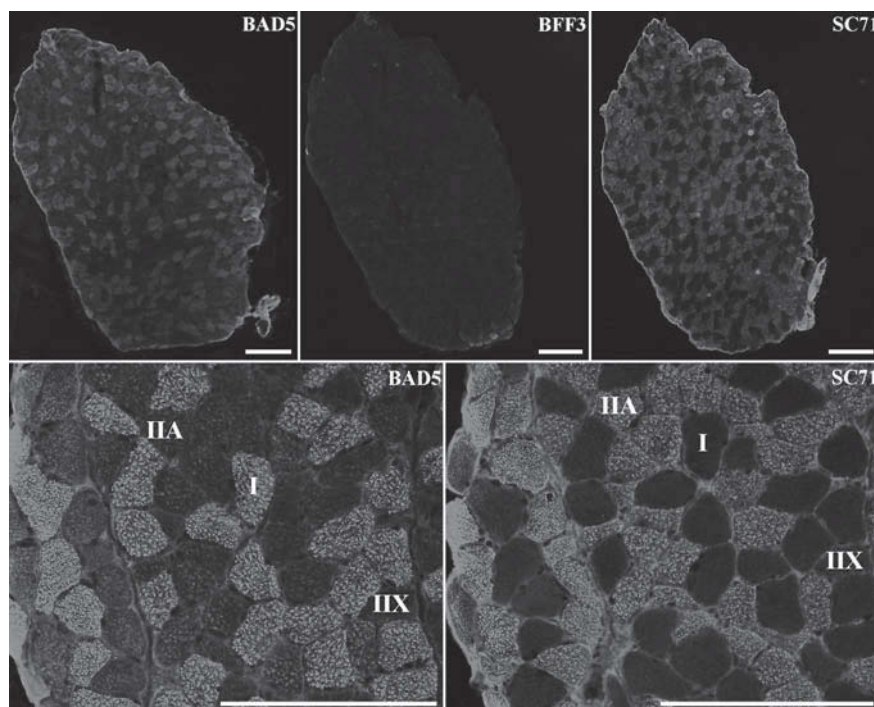


Figure 1. Serial sections of *m. Soleus*, stained with antibodies specific to MyHC I (BA-D5), MyHC IIB (BF-F3) and MyHC IIA (SC71). Scale bar: 200 μ m.

the TA (511 fibres per mm² on average). In the TA muscle, the IIB fibres had significantly the largest CSA and the IIA the lowest (Table 6). In the SOL, types I and IIX fibres had significantly the largest area compared to the IIA fibres.

Relationships between immunohistochemical classification of fibres and electrophoretic separation of MyHCs isoforms

In order to validate our classification we compared the immunohistochemical data with the proportion of each MyHC determined by electrophoresis for both muscles. We separated the four MyHC isoforms: fast (IIa, IIX, IIB) and slow (I) isoforms (Figure 4). The relative abundances of the MyHC isoforms separated by electrophoresis (Table 5) was compared to the classification of fibres obtained with the immunohistochemical technique for both muscles (Figure 5 A,B). They showed not significant differences. Electrophoresis detected the presence of MyHC IIB in the SOL which was not revealed by immunohistochemistry.

Discussion

Our objective was to simplify the semi-automatic classification of muscle fibres of Meunier *et al.*,¹⁶ by using a minimum number of antibodies. As the number of cross sections to compare will be reduced this would simplify the analysis. Moreover the cost of the histological technique would be minimized and it would save analysis time. We show that the use of only two antibodies for each muscle gives the same results than the use of several antibodies. Moreover the proportions of fibres classified with this method have been validated by the electrophoretic separation.

The proportions of the fibre types in the SOL are in agreement with immunohistochemical data from the literature for this muscle in mouse.²⁶ Agbulut *et al.*¹⁷ showed that the SOL of mouse contained two fast MyHC isoforms (IIa and IIX, 32.2% and 15.2% respectively) and MyHC I (53.6%) as a slow isoform 12 weeks after birth. These authors concluded that in adult mouse, the SOL did not contain IIB MyHC. Moreover, RT-PCR analysis showed that the IIB MyHC transcript was totally absent in the adult SOL. However in our study, the electrophoretic separation of MyHCs allowed the detection of 3% of IIB isoform in accordance with Bloemberg and Quadrilatero.²⁸ The IIB isoform detected by electrophoresis could probably be present only in hybrid IIX-B fibres containing high proportion of MyHC IIX and very low of MyHC IIB. This could explain why they are not detected by using the BF-F3 antibody in immunohistochemistry. Some studies

Table 5. Muscle fibre type proportions in the m. *Soleus* and m. *Tibialis Anterior* of C57BL6J mouse as detected by immunohistochemical and electrophoretic methods.

	I	IIA	IIX	IIB
<i>m. Soleus</i>				
Immunohistochemistry	43	46	11	0
Electrophoresis	42	44	12	3
<i>m. Tibialis Anterior</i>				
Immunohistochemistry	0	6	34	57
Electrophoresis	0	7	29	63

The BA-D5/SC71 (*m. Soleus*) and the BF-F3/SC71 (*m. Tibialis Anterior*) combinations were used (n=8 mice). The MyHC isoforms were separated by electrophoresis according to Mizunoya *et al.*²⁴ Immunohistochemical data are expressed as percent of fibre type proportion; electrophoresis data are expressed as percent abundance of each MyHC.

Table 6. Muscle fibre transversal cross-sectional areas in the m. *Soleus* and m. *Tibialis Anterior* of C57BL6J mouse.

Muscle	I	IIA	Fibre type IIA-X	IIX	IIB
CSA (µm ²) (SD)					
<i>m. Soleus</i>	1187 (308) ^a	992 (284) ^a	0 (0)	1116 (390) ^a	0
<i>m. Tibialis anterior</i>	0 (0)	768 (156) ^c	919 (190) ^c	1343 (265) ^b	2268 (436) ^a

CSA, cross-sectional areas; SD, standard deviation; n=8 mice. ^{a,b}Means with the same letter are not significantly different.

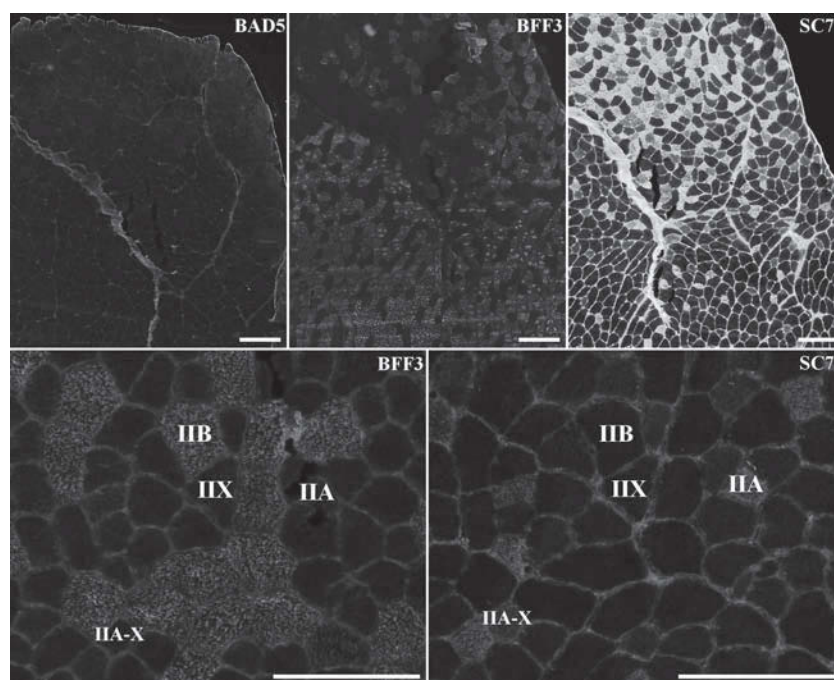


Figure 2. Serial sections of m. *Tibialis Anterior* stained with antibodies specific to MyHC I (BA-D5), MyHC IIB (BF-F3) and MyHC IIA (SC71). Scale bar: 200 µm.

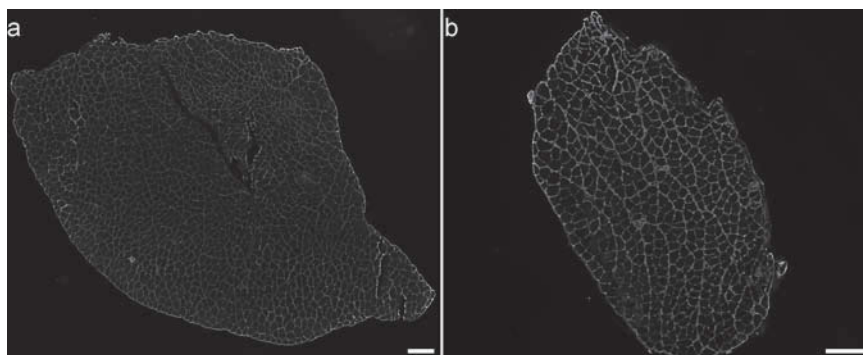


Figure 3. Laminin staining of a) m. *Tibialis Anterior*, and b) m. *Soleus* to determine the number of fibres per muscle. Scale bar: 200 µm.

have showed that the TA muscle of C57BL6J mouse had predominantly IIB fibres and less abundantly IIA-X, IIX, and IIA fibres.^{18,25,26} Zardini and Parry²⁹ also concluded that approximately 1/3 of the fibres in the TA of C57BL6J mouse were IIX type. Our classification is therefore in coherence with these data. One of the advantages of working on the mouse muscles is the possibility to have a section of the whole muscle. This is very interesting to determine the exact total number of fibres per muscle and provides a complete characterization of fibre composition. We show that it is possible for both the SOL and TA at 12 weeks of age. The image analysis allowed to evaluate the cross sectional area of each fibre type. In the SOL we showed that high oxidative fibres (type I) were not the smallest. Their cross sectional areas were similar to that of IIX fibres. In the TA the largest were the IIB fibres. These differences in CSA between the different types of fibres in SOL and TA are in accordance with the data of Bloemberg and Quadrilatero.²⁸

All these data give us confidence to validate the use of the two combinations of antibodies proposed for each muscle. Limitations of this classification could be that IIX fibres are classified only on the basis of the absence of labeling. Moreover, in some specific physiological or pathological conditions hybrid IIXB fibres could be present. Our classification allowed the observation of these hybrid fibres only by differences in labeling intensities with the different antibodies, which may be criticizable. Consequently, for a more accurate analysis we propose to first systematically use the four antibodies BA-D5/SC71/BF-F3/RTD-9 for the two muscles, as illustrated in Figure 6. In SOL the BF-F3 antibody should be used only to validate the absence of IIB fibres. In the TA the BA-D5 should be used to validate the absence of type I fibres. If these absences are validated the image-analysis could be based on the combinations of the two antibodies as proposed in this article. If these absences are not validated the image-analysis should be based on the analysis of the three serial sections stained with the three antibodies (BA-D5/SC71/BF-F3). Moreover, for the two muscles the labeling with RTD-9 antibody could be used to validate the IIX or IIXB fibres.

In conclusion, we propose a simple, fast method of characterization of muscle fibre types and CSA evaluation based on only two anti MyHC antibodies BA-D5/SC71 and BF-F3/SC71 in the *m. Soleus* and the *m. Tibialis Anterior* respectively. The classification of fibres obtained has been validated by comparison with the literature and with the classification realised by the electrophoretic separation of MyHC in the same samples. The choice of anti MyHC antibodies used for the classification should be adapted for each muscle and

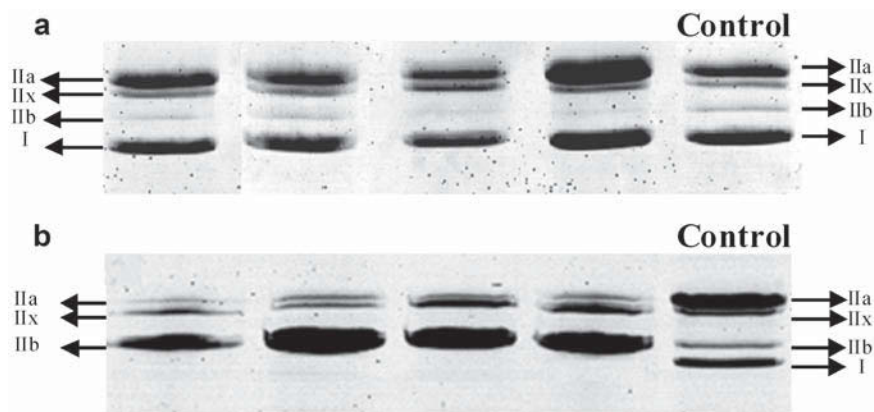


Figure 4. Electrophoretic separation of MyHC in a) *m. Soleus*, and b) *m. Tibialis Anterior*. The different wells correspond to different animals. A sample of rat *Gastrocnemius* with the four types of MyHC was used as a control.⁹

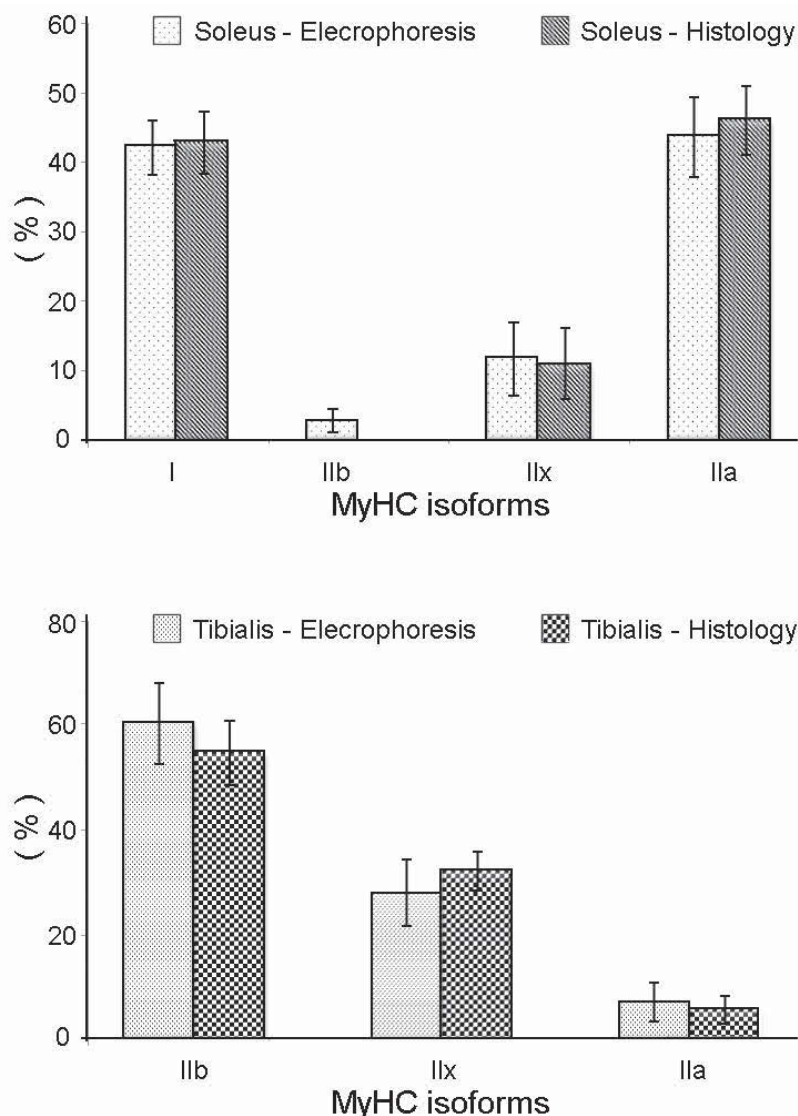


Figure 5. Proportions of the different MyHC isoforms (I, IIA, IIX) detected in a) *m. Soleus*, and b) *m. Tibialis Anterior*, with either the histological method or the electrophoretic technique. NS, not significant.

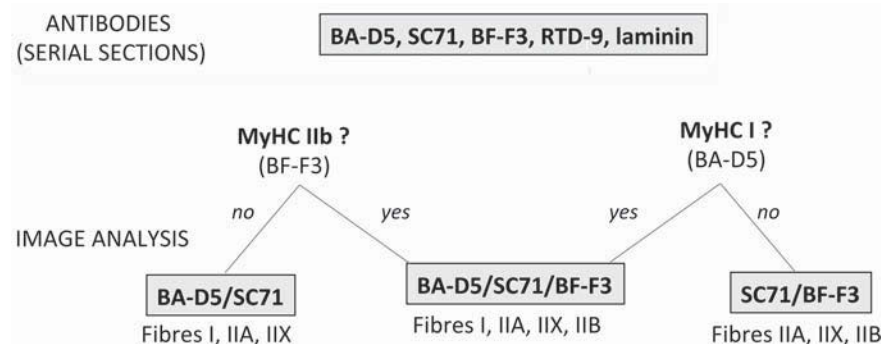


Figure 6. Strategic scheme of choice of the antibodies combinations to be used for each new experiment. It should be adapted for each muscle and each condition. The four antibodies BA-D5, SC71, BF-F3, RTD-9 should be systematically applied with laminin on serial sections. The first step is to choose the combination of antibodies for image analysis. In absence of MyHC IIb, (BF-F3 negative fibres), the BA-D5/SC71 combination should be used to discriminate type I, IIA, IIX and hybrid fibres. In absence of MyHC I (BA-D5 negative fibres), the SC71/BF-F3 combination should be used to discriminate type IIA, IIX, IIB and hybrid fibres. If these absences are not validated the image-analysis, the combination BA-D5/SC71/BF-F3 should be used for fibre typing. Labeling with RTD-9 antibody is used only to validate the presence of MyHC IIx in IIX fibres identified by the absence of any labeling.

each physiological or pathological condition studied. The advantage in mouse is that this immunohistochemical classification can be applied to the total area for muscles with small section areas. This means having information on the total number of fibres, their cross-sectional areas and their composition in absolute value rather than in proportions as in other species. Consequently this method can be applied for studies in which phenotyping of skeletal muscle is necessary, such as in mouse knock-out models.

References

1. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 2011;91:1447-531.
2. Wydro RM, Nguyen HT, Gubits RM, Nadal-Ginard B. Characterization of sarcomeric myosin heavy chain genes. *J Biol Chem* 1983;258:670-8.
3. Schiaffino S. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol* 2010; 199:451-63.
4. Barany M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 1967;50:197-218.
5. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 1970;23:369-79.
6. Guth L, Samaha FJ. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp Neurol* 1969; 25:138-52.
7. Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. Metabolic profiles of three

fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 1972;11:2627-33.

8. Reggiani C, Bottinelli R, Stienen GJM. Sarcomeric myosin isoforms: fine tuning of a molecular motor. *News Physiol Sci* 2000; 15:26-33.
9. Talmadge RJ, Roy RR. Electrophoretic separation of rat skeletal-muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* 1993; 75 (5): 2337-2340.
10. Denardi C, Ausoni S, Moretti P, Gorza L, Velleca M, Buckingham M, et al. Type-2x-myosin heavy-chain is coded by a muscle-fiber type-specific and developmentally-regulated gene. *J Cell Biol* 1993;123:823-35.
11. Duris MP, Picard B, Geay Y. Specificity of different anti-myosin heavy chain antibodies in bovine muscle. *Meat Sci* 2000;55:67-78.
12. Smerdu V, Soukup T. Demonstration of myosin heavy chain isoforms in rat and humans: the specificity of seven available monoclonal antibodies used in immunohistochemical and immunoblotting methods. *Eur J Histochem* 2008;52:179-90.
13. Lu BD, Allen DL, Leinwand LA, Lyons GE. Spatial and temporal changes in myosin heavy chain gene expression in skeletal muscle development. *Dev Biol* 1999;216: 312-26.
14. Allen DL, Leinwand LA. Postnatal myosin heavy chain isoform expression in normal mice and mice null for IIb or IId myosin heavy chains. *Dev Biol* 2001;229:383-95.
15. Karen P, Stevanec M, Smerdu V, Cvetko E, Kubinova L, Erzen I. Software for muscle fibre type classification and analysis. *Eur J Histochem* 2009;53:87-95.
16. Meunier B, Picard B, Astruc T, Labas R. Development of image analysis tool for the

classification of muscle fibre type using immunohistochemical staining. *Histochem Cell Biol* 2010;134:307-17.

17. Agbulut O, Noirez P, Beaumont F, Butler-Browne G. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. *Biol Cell* 2003;95:399-406.
18. Hamalainen N, Pette D. The histochemical profiles of fast fiber type-IIb, type-IId, and type-IIa in skeletal-muscles of mouse, rat, and rabbit. *J Histochem Cytochem* 1993; 41:733-43.
19. Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, et al. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 1989;10:197-205.
20. Duris M-P, Picard B, Geay Y. Specificity of different anti-myosin heavy chain antibodies in bovine muscle. *Meat Sci* 2000; 55 (1): 67-78.
21. Picard B, Barboiron C, Chadeyron D, Jurie C. Protocol for high-resolution electrophoresis separation of myosin heavy chain isoforms in bovine skeletal muscle. *Electrophoresis* 2011;32:1804-6.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
23. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
24. Mizunoya W, Wakamatsu JI, Tatsumi R, Ikeuchi Y. Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system. *Anal Biochem* 2008;377:111-3.
25. Sugiura T, Murakami N. Separation of myosin heavy-chain isoforms in rat skeletal-muscles by gradient sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis. *Biomed Res* 1990;11:87-91.
26. Augusto V, Padovani CR, Rocha Campos GE. Skeletal muscle fiber types in C57Bl6J mice. *Braz J Morphol Sci* 2004;27:89-94.
27. Schiaffino S, Sagin L, Viel A, Ausoni S, Sartore S, Gorza L. Muscle fiber types identified by monoclonal antibodies to myosin heavy chains, p. 27-34. In: GPL Benzi, N Siliprandi (eds.), *Biochemical aspects of physical exercise*. Amsterdam, Elsevier: 1986.
28. Bloemberg D, Quadrilatero J. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *Plos One* 2012;7:e35273.
29. Zardini DM, Parry DJ. Identification, distribution, and myosin subunit composition of type-IIx fibers in mouse muscles. *Muscle Nerve* 1994;17:1308-16.

Conclusion

Cette étude a montré que la classification semi-automatique des fibres musculaires mise au point sur le muscle bovin (Meunier *et al.*, 2010) peut être adaptée pour la classification des fibres musculaires chez la souris. L'utilisation d'une combinaison de deux anticorps anti-MyHC *seulement* sur des coupes sériées couplée avec un marquage fluorescent de la Laminine qui permet d'individualiser chaque fibre constitue une technique simple et efficace pour le typage des muscles *Tibialis anterior* et *Soleus* de souris. Cette classification a été validée par comparaison avec les données de la littérature et la classification réalisée par séparation électrophorétique de MyHC sur les mêmes échantillons. Un avantage chez la souris compte-tenu de la taille des muscles est aussi que cette classification immunohistologique peut être appliquée sur une coupe transversale du muscle entier. Ceci permet d'obtenir des informations sur le nombre total de fibres, leurs surfaces de section transversale et leur composition en valeur absolue, plutôt que des proportions comme dans les autres espèces. Cette méthode a été appliquée pour le phénotypage dans des études où le phénotypage du muscle squelettique est nécessaire, par exemple nous allons le voir ci-après, chez les modèles de souris KO HspB1. Récemment Bloemberg et Quadrilatero 2012 ont publié également de typage des fibres chez les rongeurs et chez l'homme démontrant l'importance de cette méthodologie pour le typage musculaire.

Article II : Kammoun et al.
En correction par les co-auteurs
pour soumission à «PLOS ONE»

Article II: The invalidation of HspB1 gene does not impair mouse development but alters the ultrastructural phenotype of muscles.

Kammoun M. Picard B. Astruc T. Muriel B. Blanquet V. Cassar-Malek I.

Introduction

À l'issue de plusieurs années de recherche, l'équipe Amuvi a établi une liste de bio-marqueurs de la tendreté de la viande bovine. Dans cette liste, les Heat Shock Proteins (Hsp) sont situées à des nœuds de l'interactome musculaire lié à la tendreté (Guillemin *et al.*, 2011a). Parmi elles, figure la Hsp27 qui est différentiellement exprimée entre des muscles de tendreté extrême (Picard *et al.*, 2010 ; Bernard *et al.*, 2007 ; Hocquette *et al.*, 2012). Comprendre le rôle de Hsp27 et de ses interacteurs dans l'établissement de la tendreté est un des enjeux des recherches en production de viande.

Pour examiner ce rôle, nous avons tiré parti d'un modèle animal que nous avons généré dans le programme incitatif « Phénotypage des animaux modèles » du département Phase de l'INRA, la souris présentant une invalidation du gène HspB1 codant la protéine Hsp27 (KO HspB1). Ce modèle devait permettre d'analyser les conséquences de l'absence de Hsp27 sur le développement et les caractéristiques des tissus liés à la qualité (muscle et tissus adipeux), ainsi que sur la fonctionnalité de l'interactome "tendreté". L'objectif finale était de caractériser le rôle de cette protéine dans le déterminisme de la tendreté. Le développement de ce modèle représentait un enjeu méthodologique important et un pari pour la réussite de mon projet de thèse. Il devait permettre à l'équipe de disposer d'un modèle animal pour acquérir des connaissances des connaissances à transférer ensuite à l'espèce cible, le bovin.

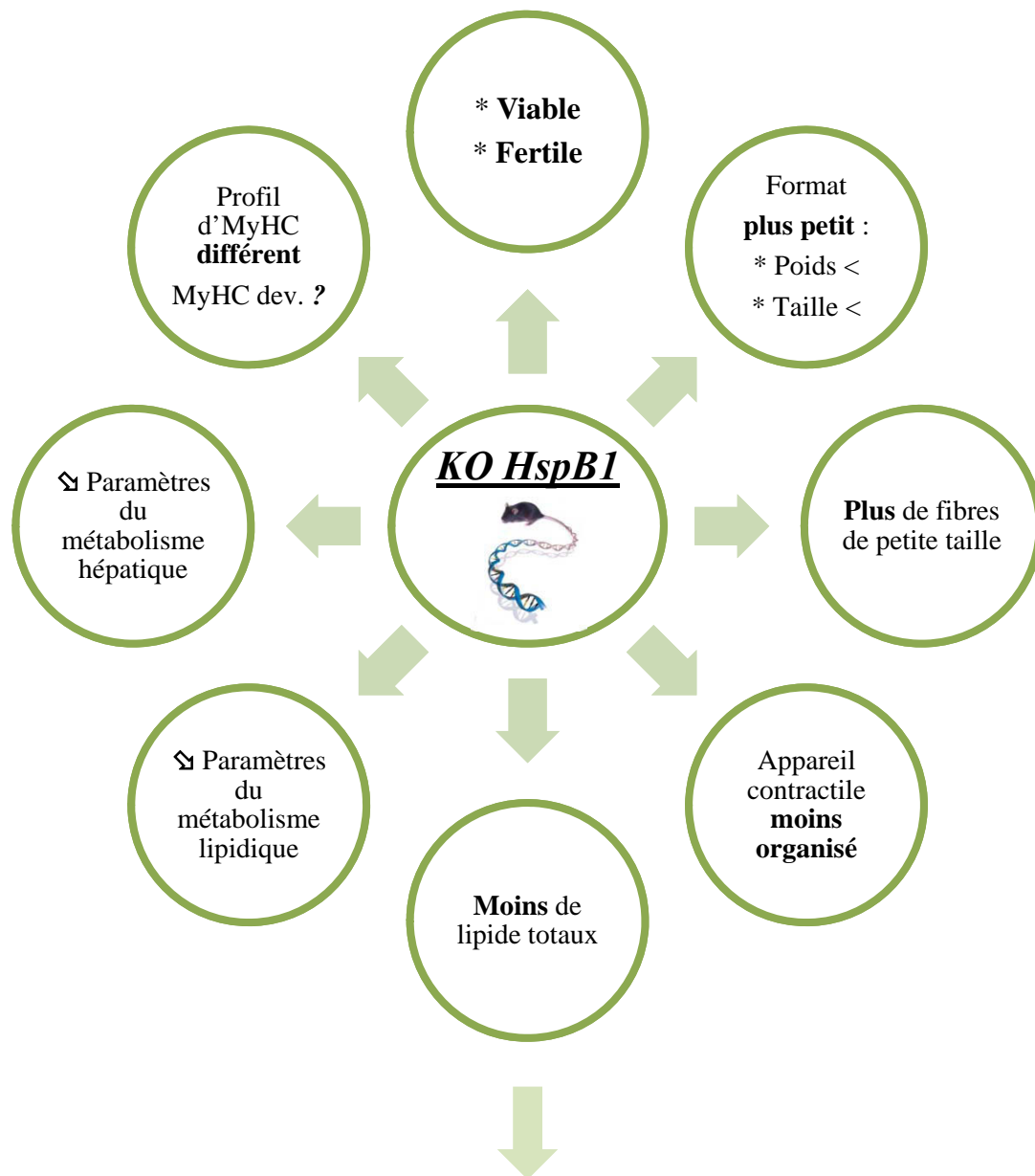
Un tel modèle n'étant pas disponible au début de ma thèse, la première étape de mon travail était d'établir une lignée de souris KO HspB1 à partir de cellules ES (HspB1^{+/-}) (Figure 16), pour laquelle le gène HspB1 était remplacé par une construction contenant un gène de sélection (Néomycine) et gène rapporteur (LacZ) (collaboration avec l'IGFL³ et le PBES⁴, Lyon). Il s'agissait ensuite de mettre en relation l'absence de Hsp27 et les phénotypes macroscopique, cellulaire et moléculaire du tissu musculaire. Ceci devait permettre de révéler des mécanismes sous la dépendance de Hsp27 régulant le développement ou l'organisation structurale du muscle, et susceptibles de contribuer au déterminisme de la tendreté.

³ Institut De Génomique Fonctionnelle De Lyon

⁴ Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris, Lyon

Résumé

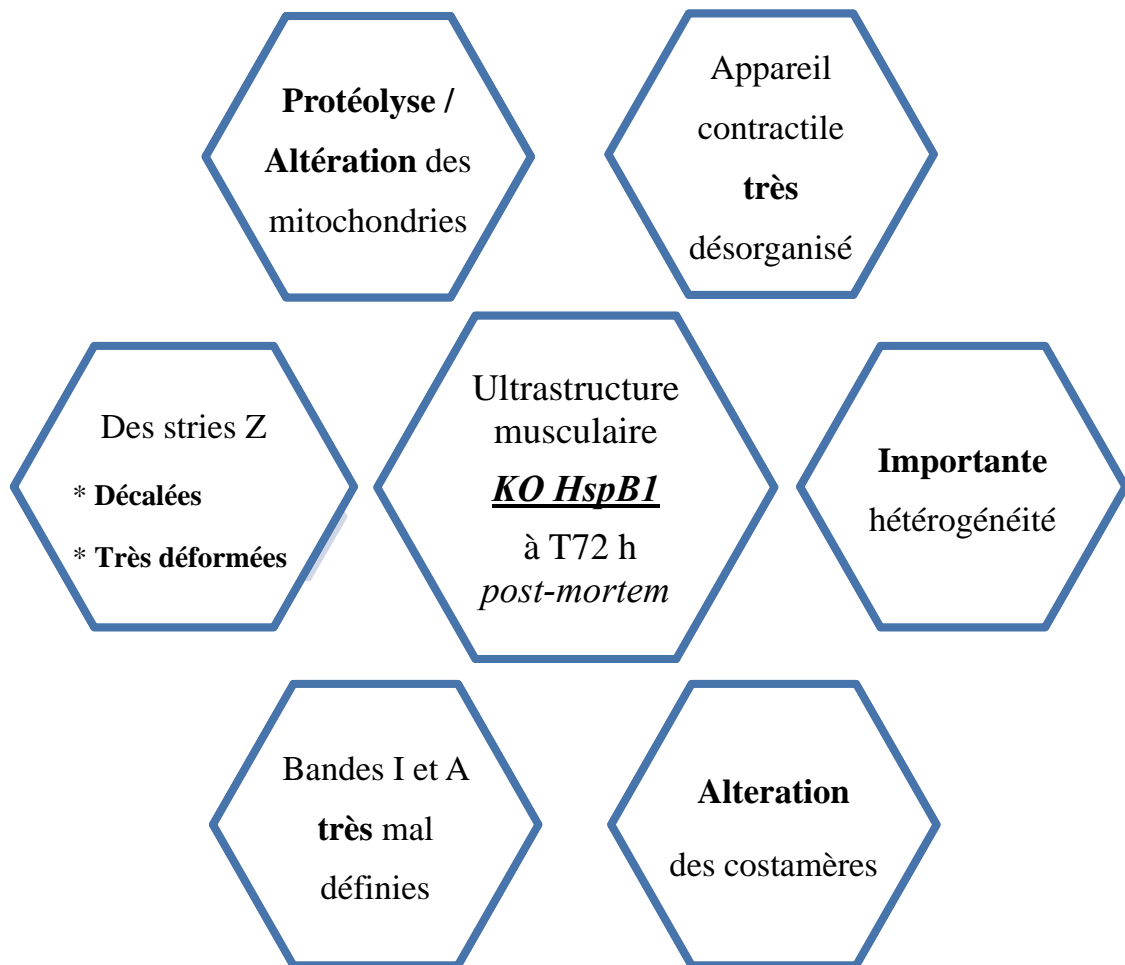
Dans cette étude, nous avons analysé les conséquences de l'invalidation du gène HspB1 (codant la Hsp27) sur le développement et les caractéristiques des tissus liés à la qualité de la viande (Figure 17). Nous avons généré par recombinaison homologue du gène HspB1 des souris dépourvues de la protéine Hsp27 comme un modèle animal. Les souris KO HspB1 sont viables et fertiles, ne présentent aucune anomalie apparente mais ont un format plus petit que celui de leurs témoins. Au niveau plasmatique, une interaction génotype x âge x sexe a été révélée pour 16 paramètres biologiques sur les 26 indicateurs métaboliques mesurés. Aucune différence n'a été observée pour les paramètres représentatifs du métabolisme musculaire. Les principales différences constatées entre les deux génotypes suggèrent des différences de métabolismes hépatique et lipidique chez les mâles et de métabolisme du glucose et de l'acide urique chez les femelles. La structure musculaire des animaux a été analysée de façon complémentaire par microscopie optique et électronique à transmission. La première approche n'a pas permis de révéler de différences dans les caractéristiques des fibres musculaires (type contractile et métabolique, forme, périmètre, surface de section) à l'exception d'une tendance pour une proportion plus élevée de fibres de petite taille chez les souris KO HspB1. Toutefois, l'analyse des profils électrophorétiques des isoformes de chaînes lourdes de Myosine suggère un retard de maturation musculaire chez les souris KO HspB1. Au niveau ultrastructural, les fibres des animaux KO HspB1 sont caractérisées, comparativement à celle des témoins, par un appareil contractile musculaire moins organisé (Figure 17) qui devient très déstructuré 72h *post-mortem* (Figure 18). Ainsi le phénotype musculaire fin des souris KO HspB1 est altéré. L'ensemble des données issues de cette étude réalisée sur une espèce modèle apporte des connaissances nouvelles sur les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans l'établissement de la tendreté de la viande bovine. Cela permettra de fournir de nouveaux éléments pour la compréhension du rôle crucial de la Hsp27 dans la tendreté de la viande



- Implication de la Hsp27 dans le métabolisme et lipidique et le déterminisme de la balance masse grasse/masse maigre dans l'organisme.
- Rôle important de la Hsp27 dans l'organisation et l'architecture de l'ultrastructure musculaire.

Figure 17. Phénotype macro /microscopique des souris mâles KO HspB1 à 12 semaines d'âge

⌘ : signifie une diminution du taux
dev. : développementale



➤ Rôle important de la Hsp27 dans le maintien de la cytosquelette.

Figure 18. Evolution de l'ultrastructure du muscle à T72 h post-mortem
h : Heure

**The invalidation of HspB1 gene does not impair mouse development
but alters the ultrastructural phenotype of muscles**

Malek Kammoun^{1,2}, Brigitte Picard^{1,2}, Thierry Astruc³, Muriel Bonnet^{1,2},
Véronique Blanquet⁴, Isabelle Cassar-Malek^{1,2*}

¹INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

²Clermont University, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-
Ferrand, France

³INRA, UR0370 Qualité des Produits Animaux, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

⁴INRA, UMR1061 Génétique Moléculaire animale, F- 87060 Limoges, France

Key words: mouse, HspB1, skeletal muscle, ultra-structure

Abstract

Understanding the role of Hsp27 in the development of muscle is one of the research challenges for livestock animals. In this study, we have analyzed the consequences of the absence of Hsp27 on the development and characteristics of tissues related to meat quality. We generated mice devoid of Hsp27 protein by homologous recombination of the HspB1 gene as an animal model. The HspB1^{-/-} mice were viable and fertile, showing no apparent abnormality but a smaller than their control format. In plasma, a genotype x age x sex interaction was revealed for 16 of the 36 plasma parameters assessed. No difference was observed for parameters representative of muscle metabolism. The main differences found between HspB1 mutants and controls suggest differences in liver and lipid metabolism in males and metabolism of glucose and uric acid in females. The muscle structure of animals was examined by optical microscopy and transmission electron microscopy. The first approach did not reveal any differences in the characteristics of muscle fibers (contractile and metabolic type, shape, perimeter, cross-sectional area) but a trend for a higher proportion of small fibers. Different myosin heavy chains electrophoretic profiles were also observed in HspB1^{-/-} mice. At the ultrastructural level, examination of the myofibrillar material showed destructured myofibrils and higher gaps between myofibrils in HspB1 mutants, and a greater disintegration of myofibrils at 72h *postmortem*. Thus, changes in the cytoskeletal organization and integrity, which were observed in the absence of Hsp27, likely affected the *post-mortem* ageing. This provided new elements for understanding the crucial role for Hsp27 in the modulation of the tenderizing process of muscle during meat ageing that should be validated in beef.

Introduction

The heat shock proteins (Hsps) have been described as a class of proteins that are up-regulated in response to various adverse changes of the environmental conditions inducing cellular stress (e.g. heat shock, nutrient deficiencies, viral infections, various chemicals) [1]. Hsps are among the most conserved molecules in phylogeny. Their up-regulation in stressful conditions is a universal phenomenon, occurring in all plant and animal species studied. In mammals, Hsps are grouped into six main families according to their molecular weight - Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp47 (Large Hsp) - and the Hsp20 family (Small Hsps, 12–43 kDa). Despite their common properties, each family has features related to their mechanism of action, their intracellular localization, their dependence on ATP as an energy substrate or inducible nature of their expression [1].

In mammals, the small Hsp family (sHsps) comprises eleven members that contain a highly conserved α -crystallin domain, with various tissue distributions [2]. sHsps play a fundamental role in cell survival through five main mechanisms: molecular chaperoning with strong anti-aggregation properties, cell protection through protein triage, interaction with the cytoskeleton, modulation of the cellular response to oxidative stress, anti-apoptotic activity [3]. sHsps are tightly regulated during development in multiple organisms [4]. Hsp27 (also denoted Hsp25 in mice) a member of the sHsp family is constitutively present in a wide variety of tissues and in many cell lines. Hsp27 is part of the Hsps chaperone network and plays a canonical role in the cellular response to stress including heat shock, oxidative stress and chemical stress. It is one of the most induced Hsps, reaching 1% of the total cellular protein, but accumulates in a slower kinetics than that of Hsp70 the other highly stress responsive Hsp [5]. To date the role of constitutively expressed Hsp27 is not fully understood. Hsp27 has been detected in zygotes and early embryos from the 2-cell stage to the blastocyst stage [6] and its expression Hsp27 is regulated during mammalian development [4]. However little is known about its role in development.

There is increasing evidence to substantiate Hsp27 as biomarker in many disease states [7] and molecular protector against disease [8] including neuromuscular diseases. sHsps are abundant and dynamically expressed *pre-* and *post-mortem* in bovine muscle [9-11]. Recent data showed that their expressions are linked to meat tenderness [12-15]. Moreover, a bioinformatic network based on a list of biomarkers of tenderness resulting from our biochemistry, proteomic and transcriptomic data [12,15-18] showed that Hsp27 was present at

node position suggesting its crucial role in tenderness [19]. At present knowledge of the relationships between Hsp27 and meat quality is limited to quantitative measures. However, the relationships between the expression of HspB1 (encoding Hsp27) and muscles characteristics are not fully understood. In this study we have questioned the role of Hsp27 in the development of mouse and especially on muscle development and structure in order to identify muscle molecular mechanisms that could account for the determinism of tenderness. For this, we generated HspB1-null mice and examined their phenotype.

Material and methods

Animals and samples

Generation HspB1-null mice

To elucidate the role of the Hsp27 protein, we generated HspB1-null mice using a conventional targeting strategy (Figure 1A).

This consisted in the replacement of the coding sequence of the HspB1 gene by a construction that contained a reporter β -gal gene. We used commercial embryonic stem cells (ES cells) in which 1.381 bases of the nucleotide sequence of the gene (<http://www.velocigene.com/komp/detail/13573>) were replaced by bacterial vector obtained from BMQ BAC library (Mouse Micer vector set 369N20). In the targeting vector, the reporter *LacZ* gene was fused in frame with the start codon of HspB1 to replace $\approx 100\%$ of the HspB1 coding sequence. The ES cells from three clones were injected into C57BL/6J blastocysts to generate 13 chimeras at the Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL) - Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES) Lyon). Male chimeras transmitting the targeted mutation were mated with females from C57BL/6J strain to generate F1 offspring at the experimental installation of nutrition and microbiology of the French National Institute for Agricultural Research (INRA-France). Heterozygous animals (HspB1^{+/-}) were identified by PCR analysis of tail DNA. PCR-based genotyping, amplifying wild type and targeted bacterial vector using, different primers described in Table 1 (Figure 1B). They were intercrossed to generate homozygous F2 mice (HspB1^{-/-}). The F2 offspring were mated in order to amplify the three strains. The mice were housed in a temperature and humidity controlled room under a 12 hours light and dark cycle. They were fed *ad libitum*. Experimental procedures and animal holding respected the French animal protection legislation including licensing of experimenters. They were controlled and approved by the

French Veterinary Services and the Committee on the Ethics on Animal Experimentation in Auvergne (agreement number CE 84-12). All efforts were made to minimize suffering.

The mice were weighed once a week during their first 12 weeks post-natally. These weights were used to establish a growth curve of body weight (BW) for each animal group and calculate the average daily gain (ADG) during this period. The BW and length of the animals were determined before their sacrifice at 4, 8 and 12 weeks of age. Their body composition was also determined using the EchoMRI™ method that offers measurements of body fat mass and lean mass in live animals.

Blood sampling

Blood samples were collected from the retro orbital sinus under general anesthesia at 4, 8 and 12 weeks old. Anesthesia was induced by placing each mouse in an inhalation chamber with 4% isoflurane regulated with calibrated vaporizer. Blood samples were deposited in tubes with Heparin as anticoagulant to prevent the formation of clots or extension of existing clots within the blood. Finally, blood samples were centrifuged at 4°C (4000 round/min, 10 min) for plasma separation. Plasmas were kept as aliquot fractions at -80°C until analysis.

Tissue collection

Among the 800 mice produced, 170 were selected to constitute 3 experimental groups with an average of 15 mice/ age group/gender. Mice were sacrificed at 8 and 12 weeks, and 12 months postnatal by cervical dislocation after anesthesia. These ages were chosen in order to analyze the effect of Hsp27 inhibition at different stages of development. Three muscles with different composition in fiber types were sampled, namely the m. *Soleus* (slow and fast oxidative), m. *Gastrocnemius* (Fast oxido-glycolytic) and m. *Tibialis Anterior* (Fast glycolytic). Three adipose tissues (AT) namely Inguinal AT, Interscapular AT, and for males Epididymal AT were sampled. The livers were also collected. All the tissues were weighted, frozen in nitrogen for molecular biology analyses and in an isopentane bath cooled by liquid nitrogen for histochemical analyses, and kept at -80°C.

Measurements

Clinical chemistry analyzes

The plasma concentrations of the 26 chemistry parameters representative of muscle, hepatic, lipid, and energetic metabolism (Urea, Glucose, Amylase, Uric acid, Phosphorus, Calcium, Cholesterol, Triglycerides, Low-density lipoprotein, High-density lipoprotein, Cholinesterase, Total bilirubin, Total Proteins, Alkaline phosphatase, Alanine aminotransferase, Aspartate aminotransferase, Iron, Albumin, Creatinine, Creatine kinase, Creatine kinase MB, Lactate, Lactate dehydrogenase, Magnesium, Transferrin and Hydroxybutyrate dehydrogenase) were measured using an automated analyzer (Faculty of Science and Technology of Limoges, France).

Hsp27 protein quantification

The abundance of Hsp27 protein was measured by Western-blotting in the m. *Soleus* and the m. *Tibialis Anterior* of HspB1-null mice vs their control littermates. Fifteen µg of proteins were separated by gel electrophoresis using SDS-PAGE for 2 h according to the Laemmli's method [20]. After migration, the proteins were transferred onto PVDF transfer membrane Millipore (Bedford, MA01730 U S A). Membranes were then blocked with 5% non-fat milk in TBS1 x buffer containing (blocking solution) and incubated under gentle agitation all the night at room temperature in the presence of the primary antibody (Hsp27 monoclonal antibody : Santa Cruz : SC13132; 1/1000). Then the membranes were incubated at 37°C for 30 min with the secondary fluorochrome-conjugated LICOR-antibody. Secondary fluorescent-conjugated IRDye 800CW antibody was supplied by LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA) and used at 1/20000. Infrared fluorescence detection was then used for protein quantification. Membranes were scanned by the scanner Odyssey (LI-COR Biosciences) at 800 nm. Band volumes were quantified in the images using ImageQuant TL v7.0 software (GE Healthcare). Protein abundance for each sample is given in arbitrary units.

Histology, immunohistochemical and β -Galactosidase staining

Serial sections, 10 µm thick, were cut on a cryostat (cryo-star HM 560 Microm International GmbH, Germany) at -26 °C, perpendicular to the muscle fibers. Adjacent sections were used for immunohistochemical and histochemical analyses and for β -Galactosidase staining.

A semi-automatic classification of fibers was used for classification of muscle fiber by using a combination of only two anti- Myosin heavy chain (MyHC) antibodies. For m. *Soleus* BA-D5

(specific of slow MyHC I) and SC71 (specific of IIa MyHC) were used on serial sections. For *m. Tibialis Anterior* BF-F3 specific of IIb MyHC and SC71 were used on serial sections according to Kammoun et al [21]. The anti- MyHC antibodies were purchased from AGRO-BIO (La ferté Saint-Aubin, France). After immuno-staining of MyHC isoforms, histological sections were visualized under an Olympus fluorescence microscope BX 51, using a 10X objective (NA = 0.3) and adequate band pass filter (Alexa 488: excitation filter 460-495, emission filter 510-550, dichromatic mirror 505LP; Cy3: excitation filter 530-550, emission filter 575-625, dichromatic mirror 565LP) as described in Meunier et al [22]. This technique allowed determining the muscle fiber type proportion, meaning cross-sectional for an average 300 fibers per serial image. These parameters give access to the relative expression of each MyHC isoform. The metabolic fiber type was also determined by revealing the succinate dehydrogenase (SDH, a mitochondrial enzyme representative of oxidative metabolism) activity according to Ashmore et Doerr, 1971 [23]. For HspB1^{-/-} mice muscles, serial sections were also stained for β -galactosidase (β -gal) activity in order to detect reporter gene expression. Individual images were assembled into composite panoramic images of MyHC analysis, SDH activity and β -gal staining.

Electrophoretic separation of MyHC isoforms

Muscle proteins were extracted with a buffer containing 0.5 M NaCl, 20 mM NaPPi, 50 mM Tris, 1 mM EDTA and 1 mM DTT according to the protocol described by Picard et al. [24]. Samples were homogenized with a polytron. Following centrifugation at 2500 x g for 10 min at 4 °C, the supernatants were diluted 1:1 (v/w) with glycerol and stored at -20°C. The protein concentration of the samples was determined according to the method of Bradford [25].

The samples were suspended in 1:1 v/v in a basic 2 x Laemmli solution containing 4 % w/v SDS, 10 % v/v β -mercaptoethanol, 20 % v/v glycerol, 125 mM Tris (pH 6.8) and 0.01 % w/v pyronin Y, incubated at room temperature for 10 min and then heated (70°C) for 10 min.

The MyHC isoforms were separated with SDS glycerol gel electrophoresis according to [20]. The stacking gel contained 4 % polyacrylamide with a cross-link of 1.96 %. The separating gel was an 8 % polyacrylamide gradient with a cross-link of 1 %, as described in Mizunoya et al. [26]. A critical factor affecting the resolution of MyHC isoforms was the addition of glycerol to the gel matrix with a final concentration of 35 % according to Sugiura and Murakami [27]. Three micrograms of myofibrillar proteins were loaded per well onto 0.75-mm-thick gels. The electrophoresis was run at a constant voltage of 140V for 15 hours at 4°C.

After migration, the gels were stained in a solution of Coomassie Blue. Gel images were captured using the Expression 10000XL Pro scanner (Epson).

Ultrastructure analysis

Soleus muscles were removed from posterior members of mice and pinned to each tendon on a plate cork preserving muscle length before dissection. Muscles were fixed overnight at 4° C by immersion in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (SCB) pH 7.2 when muscles were sampled just after animal death and pH 5.8 when muscles were fixed 72h postmortem. Small blocks (1 to 3 mm³ with fiber direction identified) were post-fixed in 1 % osmium tetroxide in 0.1 M SCB with adapted pH (7.2 or 5.8) for 1 hr at room temperature. The blocks were dehydrated through a graded series of ethanol and embedded in epoxy resin (TAAB, Eurobio France) by using an automatic microwave tissue processor for electron microscopy (EM AMW, Leica company, Vienna, Austria). Ultra-thin sections (90 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds, 1963) and observed on a transmission electron microscope (Hitachi HM 7650) at 80 kV acceleration voltage. Micrographs were generated using a Hamamatsu AMT digital camera system coupled to the microscope. All samples were prepared and observed at the Cellular Imaging Center for Health (CICS) lab at Clermont-Ferrand university campus (France).

Statistical analysis

Data were subjected to analyses of variance and mean comparison by using the Student Newman Keuls under the GLM model of SAS (Statistical Analysis System, Cary, USA). The effects tested in the model included genotype, gender, age, and the age x gender, age x genotype, gender x genotype and age x gender x genotype interactions. Data given in tables and figures are least squares mean \pm SE. For Plasma parameters, no significant age x gender, age x genotype, and gender x genotype interactions were observed, so only age x gender x genotype interaction is reported in Table 2 . For body weight evolution, the effects tested in the model included genotype, gender and genotype x gender interaction. No significant type x gender interaction was observed, so we presented only the type effect. $P < 0.05$ and $P < 0.10$ were considered statistically significant and as a tendency for a statistical significance, respectively.

Results

Generation of HspB1-null mice

The HspB1 mice were viable, fertile and born at the expected Mendelian distribution. The β -gal activity was revealed in the muscle tissue of HspB1^{-/-} (Figure 1C). Western-blotting analysis of muscles homogenates confirmed the absence of Hsp27 in HspB1^{-/-} mice (Figure 1D). The heterozygous and homozygous mice showed no apparent morphological or anatomical alterations compared to homozygous controls. The weights of new born mice were lower compared to controls (1.3 g in HspB1^{-/-} and 1.6 g in HspB1^{+/-} vs 2 g respectively, $P<0.001$) one day after birth whatever the gender.

Phenotypical analysis

For zootechnical parameters, there were no differences between genotypes ($P>0.05$, Table 2). However, a significant age \times gender \times genotype interaction was detected especially for the body weight (BW) of animals, their length and some tissue weights ($P<0.1$ to $P<0.001$; Table 2). These differences were observed from 12 weeks of age onwards (Table 3). Body length measures indicated that male and female HspB1^{-/-} mice were smaller than controls at 12 weeks old (Table 3). BW were significantly lower in male HspB1^{-/-} mice than in controls and HspB1^{+/-} heterozygous mice from 12 week-old onwards (Table 3). For females, differences were recorded only at 12 weeks and 18 months of age. Tissue weights were expressed as a proportion of animal body weights. There were no differences between groups (Table 2). Figure 2 illustrates the BW evolution from 1 to 12 weeks in the three genotypes. The BW of HspB1^{-/-} mice and HspB1^{+/-} mice significantly differed from controls from 2 to 12 weeks of age. However there were no differences in the average daily gain between groups (0.21 to 0.23, $P>0.05$). Body composition analysis showed a significant difference between HspB1^{-/-} mice and controls only at 12 weeks of age (Table 4). The amounts of fat and lean were lower in the HspB1^{-/-} mice than in controls ($P<0.001$ and $P<0.05$, respectively). The relative fat was lower in the HspB1^{-/-} mice than in controls ($P<0.05$).

For plasma chemistry parameters, 26 parameters were measured. No significant differences were detected for muscle metabolism parameters between the different genotypes of mice, or according to their gender and age. However, differences were shown for lipid metabolism and some liver enzymes. A significant age \times gender \times genotype interaction ($P<0.05$ to $P<0.001$) was detected for 16 parameters (Table 5). The male HspB1^{-/-} mice had lower mean levels of

calcium, urea, cholesterol, triglycerides, and high-density lipoprotein. Total bilirubin was higher in plasma of the male HspB1^{-/-} mice. These differences were observed across ages (8 weeks, 12 weeks, and 12 months of age) (Table 5). The evolution of plasma parameters was different between genders with lower glucose and higher uric acid levels in 12 weeks old in HspB1^{-/-} females. Total proteins levels of both male and female HspB1^{-/-} mice were significantly lower from controls at 12 weeks old.

Phenotypical changes in the muscles associated with HspB1 invalidation

Structure and fiber properties

As illustrated in Table 2, all skeletal muscles analyzed, whether oxidative or glycolytic types, showed no differences with respect to weights between HspB1^{-/-} mice and controls. For the analysis of muscle characteristics, we focused on 12 week-old male mice since they were adults and muscle weights allowed many analyses. Examination of fiber types using our recent immunohistochemical classification of skeletal muscle fibers showed that the expression of MyHC isoforms, cross-sectional areas, shapes and perimeters of fibers did not differ between genotypes in the m. *Soleus* and the m. *Tibialis anterior* (data not shown). However the frequency profiles of fibers size were different between HspB1^{-/-} mice and controls, with a tendency to higher numbers of small fibers in HspB1^{-/-} mice (Figure 3A and B) in the two muscles. SDH activity, an indicator of mitochondria numbers, revealed no obvious differences between HspB1^{-/-} mice and controls (data not shown). Revelation of β -gal activity in muscles of HspB1^{-/-} mice indicated that the HspB1 promoter driven construction was expressed in the muscles in a fiber-type specific manner (type IIB < type IIA < type I and IIX) (Figure 3D and F). Analysis of the electrophoretic MyHC revealed distinct profiles between HspB1^{-/-} mice and control in the m. *Soleus* (Figure 3G right panel). A third MyHC was detected in HspB1^{-/-} mice comparatively to controls. As illustrated in Figure 3G (left panel) this MyHC could be similar to the developmental isoform detected at 4 weeks of age in controls.

Muscle ultrastructure

Results of m. *Soleus* ultrastructure are shown on Figures 4 and 6 (samples fixed at sacrifice; T0) and on Figure 5 (samples fixed at 72 h postmortem; T72). Immediately after sacrifice, cell morphology was classic with striations representative of skeletal muscle, as well as on the control than on the KO mice (Figure 4A and 4B). The

ultrastructure of myofibrils was intact in control muscles as illustrated by elongated myofibrils, well-defined sarcolemmas and sarcomeres (longitudinally repeating subunit of myofibrils) showing aligned Z lines (Figure 4C, E). Nuclei had a normal morphology and were localized at the periphery of myofibrils (not shown on these pictures). The sarcomere length was $1.70\ \mu\text{m}$ (± 0.3) and did not differ from those of HspB1^{-/-} mice. HspB1^{-/-} mice muscle showed increased intermyofibrillar spaces (Figure 4D), and altered sarcomere structure with Z lines deformation, A band and I band junctions not well defined (Figure 4F). Compared to control, the costamers were stretched on the KO showing some disintegration of the lateral attachments between myofibrils and the sarcolemma (Figure 5). However, several fibers showed an ultrastructure similar to that of controls with good Z line morphology suggesting a strong heterogeneity in the fibers behavior in HspB1 invalidated mice. Observations showed a high density of mitochondria in HspB1^{-/-} mice and controls in accordance with the oxidative property of the m. *Soleus* (Figure 4C and D). However, an alteration was observed in the morphology of some mitochondria in HspB1^{-/-} muscles since they had an abnormal morphology. It was noteworthy that there was a high heterogeneity in the ultrastructure with altered and non altered regions (Figure 4).

After 72 hours *post-mortem*, fibers and myofibrils were still clearly identifiable as well in control mice than in mutant ones (Figure 6). Compared to T0 samples, controls T72 presented some changes in myofibril structure (Figure 6C and D). Orientation change, fragmentation, and breakages besides the Z line were observed together with a beginning of mitochondria structure alteration (Figure 6E and F). In some regions, mainly located at the extremities of fibers, extracted proteins were observed, indicating that proteolysis was on-going and nuclei appeared to be narrowed and flattened (not shown). The ultrastructural changes observed after 72 h *post-mortem* were more pronounced in the HspB1^{-/-} mice (Figure 6B, D, F) with important myofibril disruption. The sarcomere changes including Z lines, I and A bands deformations observed on the HspB1^{-/-} mice at T0 were amplified after 72h muscle storage (Figure 6D, F). However even in HspB1^{-/-} mice, several cells did not show any significant changes compared to controls. Lastly, alteration of mitochondria was observed. As in the control muscle, proteolysis could be observed in some regions of the muscle fiber and the heterogeneity was more pronounced than at T0 (Figure 6B, D, F).

Discussion

In this study, we have examined the consequences of Hsp27 targeted invalidation on the muscle phenotype of mice especially on their muscle development and characteristics. The final objective was to look for molecular mechanisms regulated by Hsp27 that could account for muscle structure and tenderness. The invalidation of HspB1 gene did not appear to have marked effect on the normal development or physiology since viable, fertile and apparently normal mice were obtained. Therefore Hsp27 alone was not essential for development under control conditions as also reported in mouse [28] and in zebrafish [29]. Observation of HspB1^{-/-} mice over a period of 18 months did not reveal any signs of morphological or physiological disturbance nor locomotion troubles or disease including neuropathy as predicted (for a review Wettsein et al, 2012). This indicated that at least the skeletal muscle but also motor neurons were functionally intact. Thus, HspB1^{-/-} mice could have adapted to the loss of Hsp27 maybe through compensatory changes in the expression of cognate members of the Hsp family since mice have genes for eleven related small heat shock proteins [2]. This was partly detected in our previous study as shown in the muscles of the HspB1^{-/-} mice [30]. However the heterozygous and homozygous mutant mice were smaller and lighter than controls mainly due to lower birth weights but with no obvious changes in their growth rate. Since HspB1 could promote bone development of bones by chaperoning the estrogen receptor [4], the lower size of mutant animals may be related to impaired fetal growth of the skeleton. Interestingly, our data suggested a more marked effect of HspB1 disruption in male than in female, especially at 12 weeks of age. Hsp27 has been reported to regulate the androgen receptor activity [31] and expression [32], and our recent data indicate that the receptor abundance was decrease in the muscle of mutant mice [33]. According to data showing that HspB1 could have an important role during testosterone-related myogenesis [34], this could also account for lower growth of mutants.

With regard to lipid profile, cholesterol, triglycerides, and high-density lipoprotein levels were significantly lower in HspB1^{-/-} mice relative to controls in association to lower relative fat. Thus invalidation of the HspB1 gene could have affected lipid metabolism. The relationship between lipid metabolism and Hsp27 is scarcely documented. However our results agreed with recent data showing a correlation between high serum antibody titers to Hsp27 and elevated triglycerides in patients with coronary artery disease [35].

Although Hsp27 is expressed at the highest levels of any tissues in muscle [36], there was no specific apparent macroscopic or microscopic muscle phenotype associated with HspB1 invalidation. Indeed, there was not any impact of HspB1 disruption neither on the relative weight of muscles nor on the size or types of muscle fibers. However, as we examined only animals postnatally it cannot be excluded that mutant muscle developed more slowly than in the presence of HspB1. Interestingly, similar observations were made in other vertebrate models, at the exception of zebrafish. In this species, HspB1 knockdown demonstrated that Hsp27 is essential for optimal growth of craniofacial myocytes [29] since myofiber size was altered.

Very specific differences between mutants and controls were detected at the molecular level in the muscles. The electrophoretic profiles of m. *Soleus* showed differences in myofibrillar proteins, especially for MyHC isoforms. The supplementary band detected at 12 weeks in HspB1^{-/-} mice could be a developmental isoform. However, this could not be validated by immunohistochemistry likely because the fast antibody cross-reacts with developmental MyHC [37]. The actual presence of a developmental isoform suggests that the kinetics of MyHC evolution during myogenesis could have differed between controls and HspB1 mutants. It could illustrate the slower development of mutant muscle as suggested above. It is also in accordance with the higher proportion of small fibers observed in HspB1^{-/-} mice which could be explained by a delay in muscle growth.

Lastly, transmission electron microscopy revealed ultra structural abnormalities in the myofibrillar structure of HspB1^{-/-} mice. Their muscle was characterized by a deformation of the myofibrillar structures, enlarged intermyofibrillar space and the presence of some altered mitochondria with grouping of subsarcolemal mitochondria in favor of a weakening of cytoskeletal network. There was heterogeneity in fiber alteration, suggesting that there could be interaction with the fiber type. There are several evidences that Hsp27 is involved in maintenance of cytoskeletal network in muscle [38]. Cytoplasmic Hsp27 is thought to interact primarily with actin microfilaments [39], while cytoplasmic alpha- β crystallin appears most frequently to interact with intermediate filament proteins e.g Desmin [40]. Hsp27 seems to modulate stability, structure and dynamics of actin filaments [41]. Interaction of Hsp27 with Desmin has also been reported in cardiomyocytes [42]. High levels of Hsp are needed in muscle tissue to prevent cellular damage during stress conditions or contractile activity [28]. Hsp27 and alpha β -crystallin are translocated from the intermyofibrillar space to the cytoskeletal/myofibrillar structures after a repeated bout of exercise [43]. They were found to

accumulate in myofibrillar structures, especially in the Z line and the intermediate filament structures, and in areas of disrupted sarcomeres.

In *Xenopus* embryos lacking Hsp27 as a result of morpholino depletion [44], defects in myofibril architecture in heart and skeletal muscle were already observed. There were evidences of failure of myofibril assembly and sarcomere formation. Accordingly, a primary function of Hsp27 may be to regulate myofibril structure in the context of mouse myogenesis. Several hypotheses can be formulated to account for the muscle ultrastructural phenotype of mutant mice. Firstly, it could result from misfolded proteins, abnormal myofibrillogenesis and disorganization / loss of costameric proteins (e.g Desmin) in the absence of Hsp27. However, the role of Hsp27 in myofibrillogenesis is not documented. Secondly, the disturbances observed may be linked to altered maintenance of muscle tissue homeostasis and activation of proteolysis through different mechanisms including proteolytic systems, apoptosis, proteasomal or autophagosomal protein degradation [45]. The specific phenotype of mutant muscle was associated with a lower abundance of Desmin (a potential substrate of the calpain system and of caspase 3) and changes of the abundance of others proteins involved in muscle structure [30].

The ultrastructural changes found 72 hours after death in the muscle fibers (e.g. degradation of the Z line region, misalignment of myofibrils, extensive sarcomere disruption, mitochondria degradation) in controls were consistent with previous observations during *post-mortem* aging of beef *Longissimus lumborum* muscle [46]. In mutant mice, these changes were even more marker, suggesting that the amplitude of muscle aging would be higher in the absence of Hsp27. This is in accordance with the *post-mortem* decrease of Hsp27 observed in bovine muscle [10]. Since Hsp27 is involved in the stabilization and regulation of myofibrillar protein, and protects actin filaments and other cytoskeletal proteins from fragmentation, these authors associated HSp27 loss to the alteration of muscle structure observed during meat aging.

In conclusion, we have showed that the absence of Hsp27 did not impair the development of mice or the macroscopic characteristic of their muscles. However our data indicate that the invalidation of the HspB1 gene could directly affect the organization of muscle cytoskeleton and accelerate the changes in muscle ultrastructure during *post-mortem* evolution. They also suggest that functional redundancy between Hsps during development (leading to a macroscopic normal phenotype), was not effective at the molecular and ultrastructural levels.

413 **Acknowledgements**

414 The authors thank D. Aubert, F. Guillou for helpful scientific discussions, and G. Gentes, Ch
415 Barboiron and N. Allegre for technical support.

416

References

1. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, et al. (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress & Chaperones* 14: 105-111.
2. Fontaine JM, Sun XK, Benndorf R, Welsh MJ (2005) Interactions of HSP22 (HSPB8) with HSP20, alpha B-crystallin, and HSPB3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337: 1006-1011.
3. Garrido C, Paul C, Seigneuric R, Kampinga HH (2012) The small heat shock proteins family: The long forgotten chaperones. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44: 1588-1592.
4. Morrow G, Tanguay RM (2012) Small heat shock protein expression and functions during development. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44: 1613-1621.
5. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, et al. (2006) Heat shock proteins 27 and 70. *Cell Cycle* 5: 2592-2601.
6. Liu HY, Lundh T, Dicksved J, Lindberg JE (2012) Expression of heat shock protein 27 in gut tissue of growing pigs fed diets without and with inclusion of chicory fiber. *Journal of Animal Science* 90: 25-27.
7. Vidyasagar A, Wilson NA, Djamali A (2012) Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5: 7.
8. Kargul J, Laurent GJ (2012) Small heat shock proteins: Molecular protectors against the disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44: 1587-1587.
9. Jia X, Ekman M, Grove H, Faergestad E, Aass L, et al. (2007) Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early post-mortem storage period. *J Proteome Res* 6: 2720 - 2731.
10. Jia X, Hollung K, Therkildsen M, Hildrum KI, Bendixen E (2006) Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. longissimus dorsi and M. semitendinosus. *Proteomics* 6: 936-944.
11. Pulford D, Fraga Vazquez S, Frost D, Fraser-Smith E, Dobbie P, et al. (2008) The intracellular distribution of small heat shock proteins in post-mortem beef is determined by ultimate pH. *Meat Sci* 79: 623 - 630.
12. Bernard C, Cassar-Malek I, Le Cunff M, Dubroeuq H, Renand G, et al. (2007) New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5229 - 5237.
13. Picard B. Relationship between muscle fibers, growth efficiency and beef quality; 2012; Viçosa, Minas Gerais (Brasil).
14. Hwang IH, Park BY, Kim JH, Cho SH, Lee JM (2005) Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus. *Meat Science* 69: 79-91.
15. Kim N, Cho S, Lee S, Park H, Lee C, et al. (2008) Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Science* 80: 1068-1073.
16. Morzel M, Terlouw C, Chambon C, Micol D, Picard B (2008) Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Science* 78: 297-304.
17. Hocquette JF, Botreau R, Picard B, Jacquet A, Pethick DW, et al. (2012) Opportunities for predicting and manipulating beef quality. *Meat Science* 92: 197-209.
18. Hocquette JF, Bernard-Capel C, Vidal V, Jesson B, Leveziel H, et al. (2012) The GENOTEND chip: a new tool to analyse gene expression in muscles of beef cattle for beef quality prediction. *BMC Veterinary Research* 8: (15 August 2012).

19. Guillemin N, Bonnet M, Jurie C, Picard B (2011) Functional analysis of beef tenderness. *Journal of Proteomics* 75: 352-365.
20. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
21. Kammoun M, Cassar-Malek I, Meunier B, Picard B (2013) A reliable immunohistochemical classification of skeletal muscle fibres in mice. *European Journal of Histochemistry* submitted.
22. Meunier B, Picard B, Astruc T, Labas R (2010) Development of image analysis tool for the classification of muscle fibre type using immunohistochemical staining. *Histochemistry and Cell Biology* 134: 307-317.
23. Ashmore CR, Doerr L (1971) Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Exp Neurol* 31: 408-418.
24. Picard B, Barboiron C, Chadeyron D, Jurie C (2011) Protocol for high-resolution electrophoresis separation of myosin heavy chain isoforms in bovine skeletal muscle. *Electrophoresis* 32: 1804-1806.
25. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
26. Mizunoya W, Wakamatsu JI, Tatsumi R, Ikeuchi Y (2008) Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system. *Analytical Biochemistry* 377: 111-113.
27. Sugiura T, Murakami N (1990) Separation of myosin heavy-chain isoforms in rat skeletal-muscles by gradient sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis. *Biomedical Research-Tokyo* 11: 87-91.
28. Huang L, Min JN, Masters S, Mivechi NF, Moskophidis D (2007) Insights into function and regulation of small heat shock protein 25 (HSPB1) in a mouse model with targeted gene disruption. *Genesis* 45: 487-501.
29. Middleton RC, Shelden EA (2013) Small heat shock protein HSPB1 regulates growth of embryonic zebrafish craniofacial muscles. *Experimental Cell Research* 319: 860-874.
30. Kammoun M, Picard B, Henry-Berger J, Cassar-Malek I (2013) A network-based approach for predicting Hsp27 knock-out targets computational and Structural Biotechnology Journal submitted.
31. Zoubeydi A, Zardan A, Beraldi E, Fazli L, Sowery R, et al. (2007) Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity. *Cancer Res* 67: 10455-10465.
32. Stope MB, Schubert T, Staar D, Ronnau C, Streitborger A, et al. (2012) Effect of the heat shock protein HSP27 on androgen receptor expression and function in prostate cancer cells. *World Journal of Urology* 30: 327-331.
33. Kammoun M, Cassar-Malek I, Barboiron C, Meunier B, Chambon C, et al. (2013) A proteomic based approach for revealing HSP27 knock-out targets. *Journal of proteomics* submitted.
34. Zhang Q, Lee HG, Han JA, Kang SK, Lee NK, et al. (2012) Differentially expressed proteins associated with myogenesis and adipogenesis in skeletal muscle and adipose tissue between bulls and steers. *Molecular Biology Reports* 39: 953-960.
35. Sahebkar A, Pourghadamyari H, Moohebati M, Parizadeh SMR, Falsoleiman H, et al. (2011) A cross-sectional study of the association between heat shock protein 27 antibody titers, pro-oxidant-antioxidant balance and metabolic syndrome in patients with angiographically-defined coronary artery disease. *Clinical Biochemistry* 44: 1390-1395.
36. Neuffer PD, Benjamin IJ (1996) Differential Expression of α B-Crystallin and Hsp27 in Skeletal Muscle during Continuous Contractile Activity: RELATIONSHIP TO MYOGENIC REGULATORY FACTORS. *Journal of Biological Chemistry* 271: 24089-24095.

-
37. Picard B, Duris MP, Jurie C (1998) Classification of bovine muscle fibres by different histochemical techniques. *Histochemical Journal* 30: 473-479.
38. Tucker NR, Ustyugov A, Bryantsev AL, Konkel ME, Shelden EA (2009) Hsp27 is persistently expressed in zebrafish skeletal and cardiac muscle tissues but dispensable for their morphogenesis. *Cell Stress & Chaperones* 14: 521-533.
39. Mounier N, Arrigo AP (2002) Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress & Chaperones* 7: 167-176.
40. Perng MD, Cairns L, van den Ijssel P, Prescott A, Hutcheson AM, et al. (1999) Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alpha B-crystallin. *Journal of Cell Science* 112: 2099-2112.
41. Guay J, Lambert H, GingrasBreton G, Lavoie JN, Huot J, et al. (1997) Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *Journal of Cell Science* 110: 357-368.
42. Tucker NR, Shelden EA (2009) Hsp27 associates with the titin filament system in heat-shocked zebrafish cardiomyocytes. *Experimental Cell Research* 315: 3176-3186.
43. Paulsen G, Lauritzen F, Bayer ML, Kalhovde JM, Ugelstad I, et al. (2009) Subcellular movement and expression of HSP27, alpha beta-crystallin, and HSP70 after two bouts of eccentric exercise in humans. *Journal of Applied Physiology* 107: 570-582.
44. Brown DD, Christine KS, Showell C, Conlon FL (2007) Small heat shock protein hsp27 is required for proper heart tube formation. *Genesis* 45: 667-678.
45. Acunzo J, Katsogiannou M, Rocchi P (2012) Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), alpha B-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44: 1622-1631.
46. Hwang IH, Thompson JM (2002) A technique to quantify the extent of postmortem degradation of meat ultrastructure. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 15: 111-116.

Table 1. Primer sequences for PCR-based genotyping of mice

Primers	Sequence
P1	CTC GGA GAT CCG ACA GAC G TCT GGG CAC AAGGGA AAC TC
P2	GGG CTG CTT CTG ACC TTC TG CCA TGT TCG TCC TGC CTT TC
P3	TCC AGC TAC CGG TATTAC GC CTC TGC ATT CCT CCC CCT AA
P4	GGT TAT CTC TTT TCC CAC AG ATT ATG GTG GGC TAG GGA TG
P5	TTG ACT GTA GCG GGCT GAT GTT G GGT AAA CTG GCT CGG ATT AGG G
P6	TAC TTT CTC GGC AGG AGC AAG GTG TGG GAT CGG CCA TTG AAC AAG ATG

The pairs of primers and their target sequences are presented in Figure 1A

Table 2. Influence of HspB1 disruption on Growth, and tissue weight measurements of mice.

	Type	Gender	Age	Age x Gender	Age x Type	Gender x Type	Age x Gender x Type
Body weight	NS	***	***	***	*	NS	***
Length	NS	**	***	*	*	NS	t
m. <i>Soleus</i>	NS	NS	***	*	NS	NS	*
m. <i>Gastrocnemius</i>	NS	**	***	**	NS	NS	NS
m. <i>Tibialis-Anterior</i>	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS
AT. Epididymal	NS	***	***	***	NS	NS	***
AT. Inguinal	NS	NS	***	NS	*	NS	NS
AT. Interscapular	NS	**	***	**	NS	NS	*
Liver	NS	NS	***	NS	NS	NS	*
Fat	NS	t	***	NS	*	NS	NS
Lean	NS	*	***	NS	*	NS	NS

$t < 0.1$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; NS: not significant

Muscle weight, adipose tissues (AT) weight, Liver weight, Fat and Lean are relative to animal body weight.

$HspB1^{-/-}$: *HspB1*-null mice (N=58); $HspB1^{+/-}$: heterozygous *HspB1* mice (N=61); $HspB1^{+/+}$: Wild type BLC57 mice (N=54)
Male (N=96); Female (N=77)

8 weeks (N=63); 12 weeks (N=70); 12 months (N=18); 18 months (N=22)

m.: muscle

Table 3. Influence of HspB1 disruption on the mean body weight and length of mice during postnatal growth.

Age		8 weeks		12 weeks		12 months		18 months	
Gender		M	F	M	F	M	F	M	F
Body weight (g)	HspB1 ^{+/+}	21.2	16.75	25.83 ^a	22.40 ^a	37.89 ^b	25.78	35.63 ^a	27.60 ^a
	HspB1 ^{+/-}	19.92	17.44	23.70 ^b	19.20 ^b	42.04 ^a	28.86	35.48 ^a	29.33 ^a
	HspB1 ^{-/-}	20.92	17.93	23.86 ^b	19.27 ^b	33.86 ^c	27.49	30.61 ^b	24.35 ^b
Body length (cm)	HspB1 ^{+/+}	6.48	6.01	6.92 ^a	6.59 ^a	7.93 ^b	7.53	8.15 ^b	7.46
	HspB1 ^{+/-}	6.33	6.11	6.71 ^{ab}	6.16 ^b	8.43 ^a	7.8	8.70 ^a	7.52
	HspB1 ^{-/-}	6.55	6.16	6.66 ^b	6.23 ^b	7.70 ^b	7.67	8.50 ^{ab}	7.45

^{a, b} LS-means with different superscripts within a column for each variable are significantly different between genotypes ($P < 0.05$)

Numbers of animals were:

HspB1^{-/-}: HspB1-null mice (N= 58); HspB1^{+/-}: heterozygous HspB1 mice (N=61); HspB1^{+/+}: Wild type BLC57 mice (N= 54)

M: Male (N=96); F: Female (N=77)

8 weeks (N=63); 12 weeks (N=70); 12 months (N=18); 18 months (N=22)

(g): gram

(cm): centimeter

Table 4. Influence of HspB1 disruption on mice body composition at 12 weeks of age.

Genotype		Age		
		4 weeks	8 weeks	12 weeks
rFat	HspB1 ^{-/-}	6.91	8.55	7.6 ^b
	HspB1 ^{+/-}	5.53	6.61	7.2 ^b
	HspB1 ^{+/+}	7.90	8.46	9.2 ^a
rLean	HspB1 ^{-/-}	92.44	86.35	87.8
	HspB1 ^{+/-}	90.42	87.24	88.6
	HspB1 ^{+/+}	93.64	86.84	85.9

HspB1^{-/-}: HspB1 null- mice;

HspB1^{+/-}: heterozygous HspB1 mice;

HspB1^{+/+}: control littermates; WK: week

rFat: Fat relative to the weight of the animal

rLean: Lean relative to the weight of the animal

HspB1^{-/-}: 20 mice; HspB1^{+/-}: 11 mice; HspB1^{+/+}: 9 mice

Table 5. Influence of HspB1 disruption on the plasma chemistry parameters during postnatal growth.

Age	Gender	Type	Urea	Glucose	Calcium	Amylase	Uric acid	Phosphor	Cholesterol	Triglycerides	Cholinesterase	Total bilirubin	Total Pteines	Alkaline phosphatase	Low-density lipoprotein	High-density lipoprotein	Alanine aminotransferase	Aspartate aminotransferase
8 weeks	M	HspB1 ^{-/-}	9.04	13.03	2.02 ^b	2718.19	54.48 ^b	3.09	2.19 ^b	0.93 ^b	1244.66 ^{ab}	1.34 ^a	52.16	149.99	0.19	1.65	22.33	78.95
		HspB1 ^{+/-}	10.53	12.87	2.33 ^{ab}	2805.04	103.33 ^a	2.88	2.27 ^{ab}	1.87 ^a	1374.08 ^a	0.82 ^b	53.96	174.77	0.13	1.53	21.68	84.49
		HspB1 ^{+/+}	9.51	13.04	2.35 ^a	2663.50	81.63 ^a	2.99	2.46 ^a	1.11 ^b	1121.73 ^b	1.15 ^{ab}	52.61	168.09	0.23	1.75	20.89	106.18
	F	HspB1 ^{-/-}	10.28 ^{ab}	12.58	2.10	2654.46	79.73	2.75	1.94	0.94 ^b	1581.54 ^b	1.39	53.52	158.60 ^b	0.27 ^{ab}	1.37	26.84	136.30
		HspB1 ^{+/-}	12.50 ^a	12.12	2.24	2430.34	53.99	2.53	1.95	1.52 ^a	1879.86 ^a	1.11	54.75	189.59 ^{ab}	0.15 ^b	1.23	26.15	127.79
		HspB1 ^{+/+}	8.80 ^b	12.49	2.29	2342.95	88.05	2.86	2.08	0.94 ^b	1349.69 ^c	1.28	51.53	204.03 ^a	0.34 ^a	1.42	19.06	100.47
12 weeks	M	HspB1 ^{-/-}	8.26 ^c	11.42	2.00 ^b	2802.07	74.00	2.84 ^a	2.24 ^b	0.75 ^b	1337.83	1.76 ^a	53.89 ^b	102.47	0.19	1.69 ^b	30.97	100.28
		HspB1 ^{+/-}	11.49 ^a	11.03	2.19 ^{ab}	2693.28	57.07	2.24 ^b	2.25 ^b	1.34 ^a	1313.81	1.03 ^b	55.45 ^b	92.31	0.13	1.64 ^b	29.02	102.53
		HspB1 ^{+/+}	9.91 ^b	10.49	2.27 ^a	2897.50	75.98	2.51 ^{ab}	2.53 ^a	1.13 ^a	1402.19	1.17 ^b	60.15 ^a	99.17	0.16	1.87 ^a	51.14	93.29
	F	HspB1 ^{-/-}	7.96	10.16 ^b	1.73 ^b	2243.50	105.24 ^a	2.84	1.84 ^{ab}	0.8	1671.25	1.32 ^{ab}	52.19 ^b	129.47	0.32 ^a	1.20 ^b	16.59	64.70 ^a
		HspB1 ^{+/-}	10.30	12.27 ^{ab}	1.97 ^{ab}	2641.94	52.43 ^b	2.48	1.67 ^b	1.06	1879.65	1.06 ^b	53.72 ^{ab}	131.88	0.16 ^b	1.20 ^b	23.16	83.59 ^{ab}
		HspB1 ^{+/+}	10.03	14.37 ^a	2.19 ^a	2540.60	70.21 ^b	2.36	2.04 ^a	0.79	1885.73	1.51 ^a	57.68 ^a	133.38	0.23 ^{ab}	1.48 ^a	31.96	119.81 ^a
12 months	M	HspB1 ^{-/-}	9.43	10.12	2.28	3892.38	101.50 ^b	2.37	2.39 ^b	1.02 ^b	1437.60 ^{ab}	1.92 ^a	62.14	72.86	0.13	1.71 ^b	171.91 ^b	149.20
		HspB1 ^{+/-}	10.30	9.78	2.31	3496.43	144.55 ^a	2.02	2.30 ^b	1.19 ^b	1658.21 ^a	1.08 ^b	61.90	57.92	0.14	1.61 ^b	93.37 ^a	133.45
		HspB1 ^{+/+}	10.08	10.64	2.26	3621.37	79.85 ^b	2.13	2.95 ^a	1.80 ^a	1381.50 ^b	0.89 ^b	56.77	47.19	0.16	2.11 ^a	118.70 ^{ab}	109.53
	F	HspB1 ^{-/-}	12.81 ^a	11.64 ^a	2.19	2961.89	63.56	2.13	1.77	1.17	2286.65	1.09	54.82	102.11	0.17	1.20	42.55	145.30
		HspB1 ^{+/-}	9.60 ^b	11.78 ^a	2.15	2925.41	60.90	1.69	1.97	0.99	2221.12	1.71	59.08	105.45	0.22	1.34	44.73	136.06
		HspB1 ^{+/+}	11.84 ^a	8.73 ^b	2.22	2648.84	73.42	2.04	2.02	0.96	2120.14	1.53	58.67	95.30	0.19	1.39	46.93	119.29
Signification (Age x Gender x type)			***	**	*	***	**	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; NS: not significant

^{a, b, c} LS-means with different superscripts within a column (by Age/Gender/Typr) are significantly different ($P < 0.05$).

HspB1^{-/-}: HspB1-null mice (N= 27); HspB1^{+/-}: heterozygous HspB1 mice (N= 24); HspB1^{+/+}: control littermates (N=30)

M: Male (N= 47); F: Female (N=34)

8 weeks (N=28); 12 weeks (N=35); 12 months (N=18)

Figure Legends

Figure 1. Generation of HspB1^{-/-} mice: Genotyping and Hsp27 expression.

Diagrammatic representation of:

(A) Genomic structure of HspB1 gene and the targeting vector. The targeting vector was constructed by replacing 7.2 kb of genomic DNA, including the three exons of HspB1 gene, with a neomycin resistance (Neo) gene and LacZ reporter gene. Primers for PCR are indicated. The sequences of primers is presented in Table 1.

(B) PCR-based genotyping amplifies targeted construction of LacZ reporter gene and Neo gene by using primers P5 and P6 respectively.

(C) β -gal activity in the m. *Tibialis anterior* of HspB1^{-/-}.

β -gal activity encoded by the LacZ reporter gene was used to monitor gene expression

(D) The absence of Hsp27 at the protein level was confirmed by Western-blotting of muscle homogenates prepared from HspB1^{-/-} and HspB1^{+/+} mice.

Figure 2. Influence of HspB1 disruption on the evolution of body weight from 1 to 12 weeks of age.

HspB1^{-/-}: HspB1-null mice; HspB1^{+/-}: heterozygous HspB1 mice; HspB1^{+/+}: control littermates

ADG: Average Daily Gain

Numbers of animals were: HspB1^{-/-}: 20 mice; HspB1^{+/-}: 13 mice; HspB1^{+/+}: 10 mice

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

(g): gram

Figure 3. Influence of HspB1 invalidation on muscle characteristics.

Frequency profiles of muscle fiber cross sectional area at 12 weeks of age in m. *Soleus* (A) and m. *Tibialis anterior* (B).

Myosin heavy chain immunostaining and β -gal activity staining in muscles of HspB1^{-/-} mice at 12 weeks of age: m. *Soleus*: (C) BA-D5 immuno-staining; (D) β -gal staining m. *Tibialis anterior*: (E) BF-F3 immuno-staining; (F) β -gal staining. Scale bar: 50 μ m.

(G) Myosin heavy chain (MyHC) profiles in the m. *Soleus* at 12 weeks of age.

The left panel shows a kinetics of MyHC evolution from 4 to 12 weeks of age in HspB1^{+/+} mice. The right panel is a comparison of MyHC profiles between HspB1^{+/+} and HspB1^{-/-} mice.

wk: week

I: Slow oxidative fiber; IIA, IIX: Fast oxydo-glycolytic fiber; IIB: Fast glycolytic fiber

Figure 4. Ultrastructure of mice soleus muscle fixed immediately after sacrifice.

A, C, and E: HspB1^{+/+} (control mice); B, D, and F: HspB1^{-/-} (HspB1-null mice)
 Fi: muscle fiber, ECS: extra cellular space, My: Myofibril, EMyS: Extramyofibrillar space,
 Mi: Mitochondria, Sr: Sarcomere, A: A band, I: I band

Figure 5. Electron micrograph of lateral attachments between myofibrils to the sarcolemma at T0 h post-mortem.

(A) shows well defined sarcolemmas in HspB1^{+/+} mice (control mice)
 (B) shows a disintegration of the lateral attachments between myofibrils to the sarcolemma in
 HspB1^{-/-} mice (HspB1-null mice)
 Fi: muscle fibre, My: Myofibril, Mi: Mitochondria, N: Muscle cell nucleus, C: Costameres,
 D: Desmin Filaments, S: Sarcolemma, EMyS: Extramyofibrillar space

Figure 6. Ultrastructure of mice soleus muscle fixed at 72 hr post mortem after sacrifice.

A, C, and E: HspB1^{+/+} (control mice); B, D, and F: HspB1^{-/-} (HspB1-null mice)
 Fi: muscle fibre, ECS: extra cellular space, My: Myofibril, Mi: Mitochondria, N: Muscle cell
 nucleus Sr: Sarcomere, A: A band, I: I band
 The muscles were sampled and stored as described in Material and Methods.

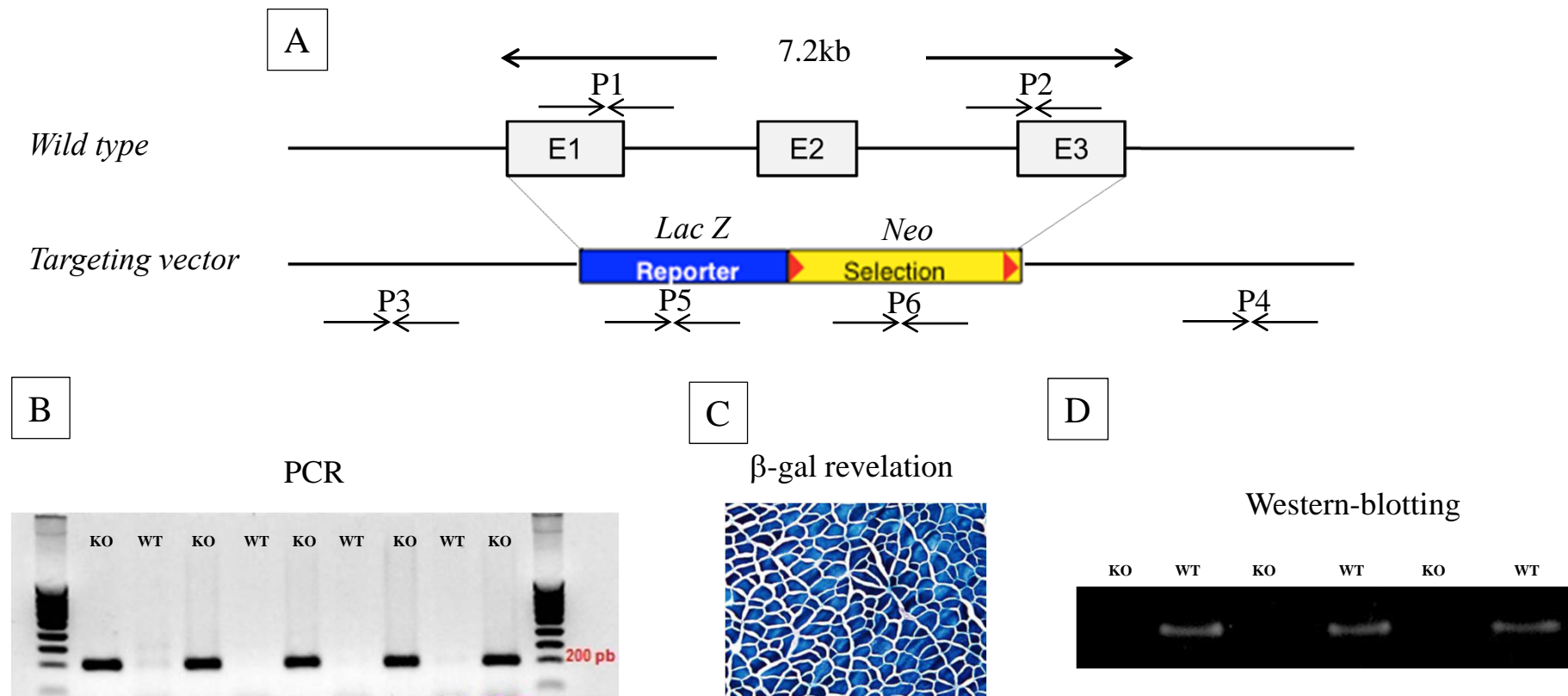


Figure 1.

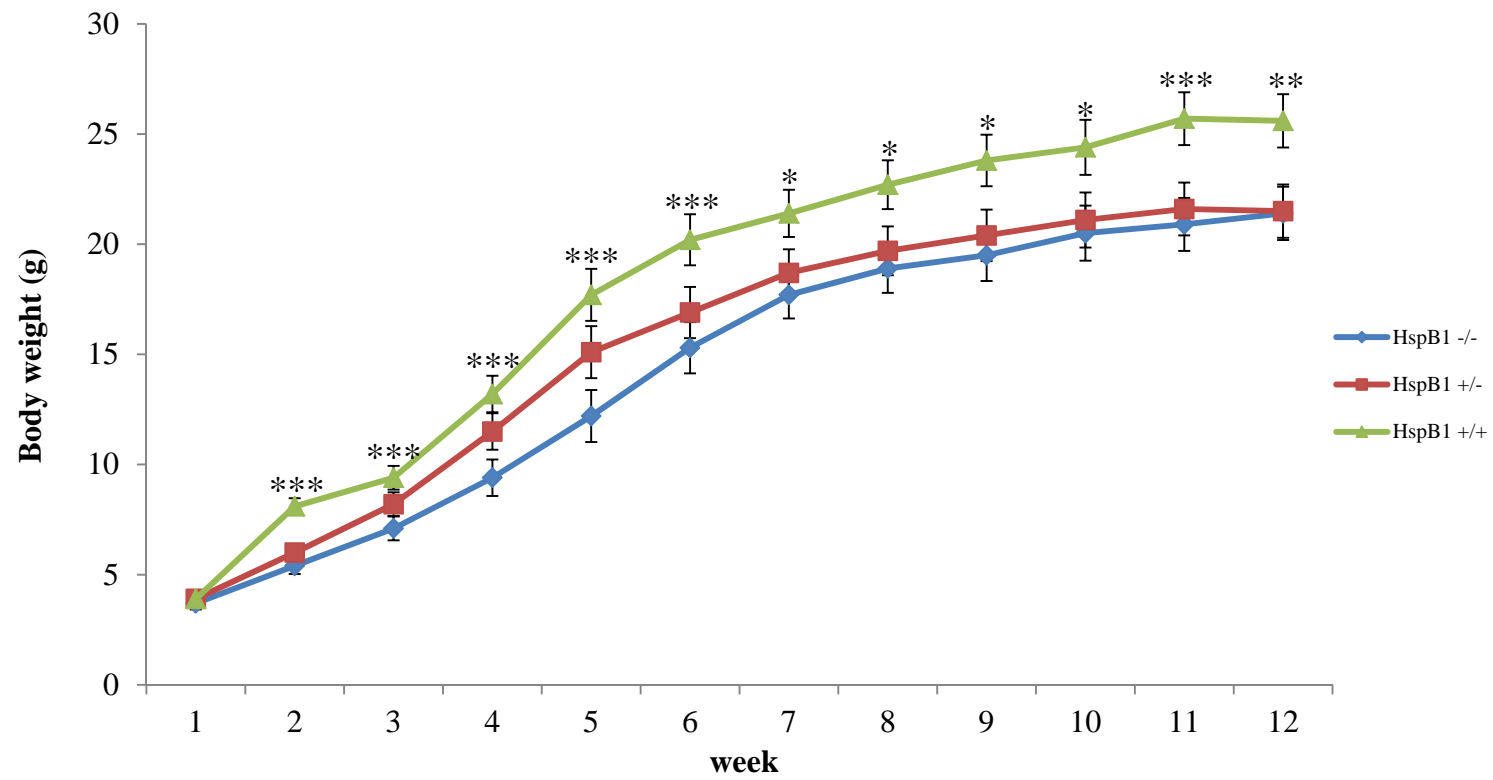


Figure 2.

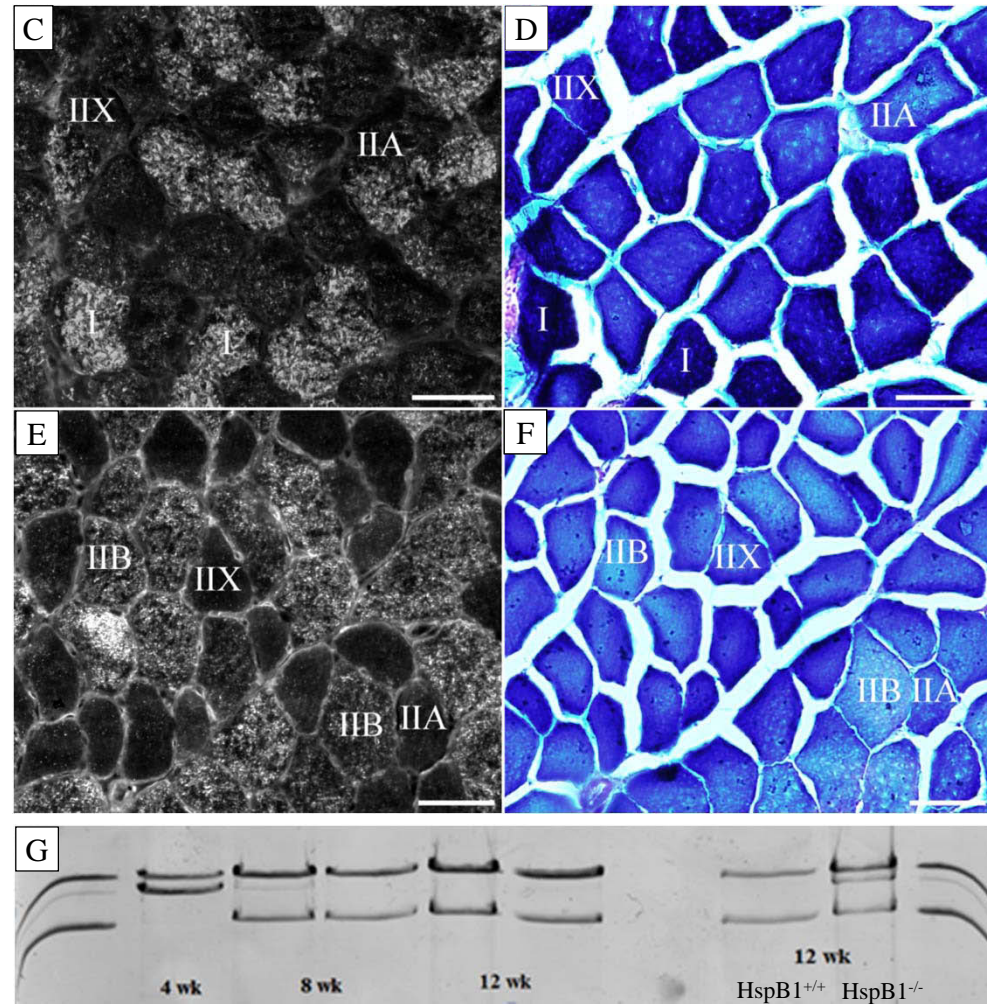
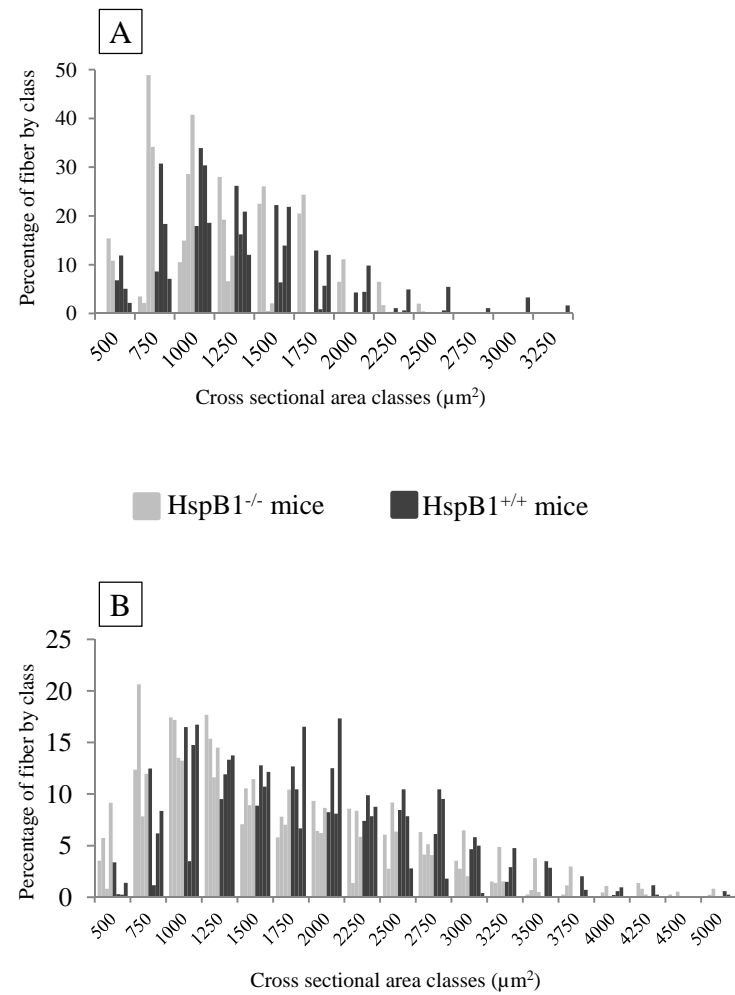


Figure 3.

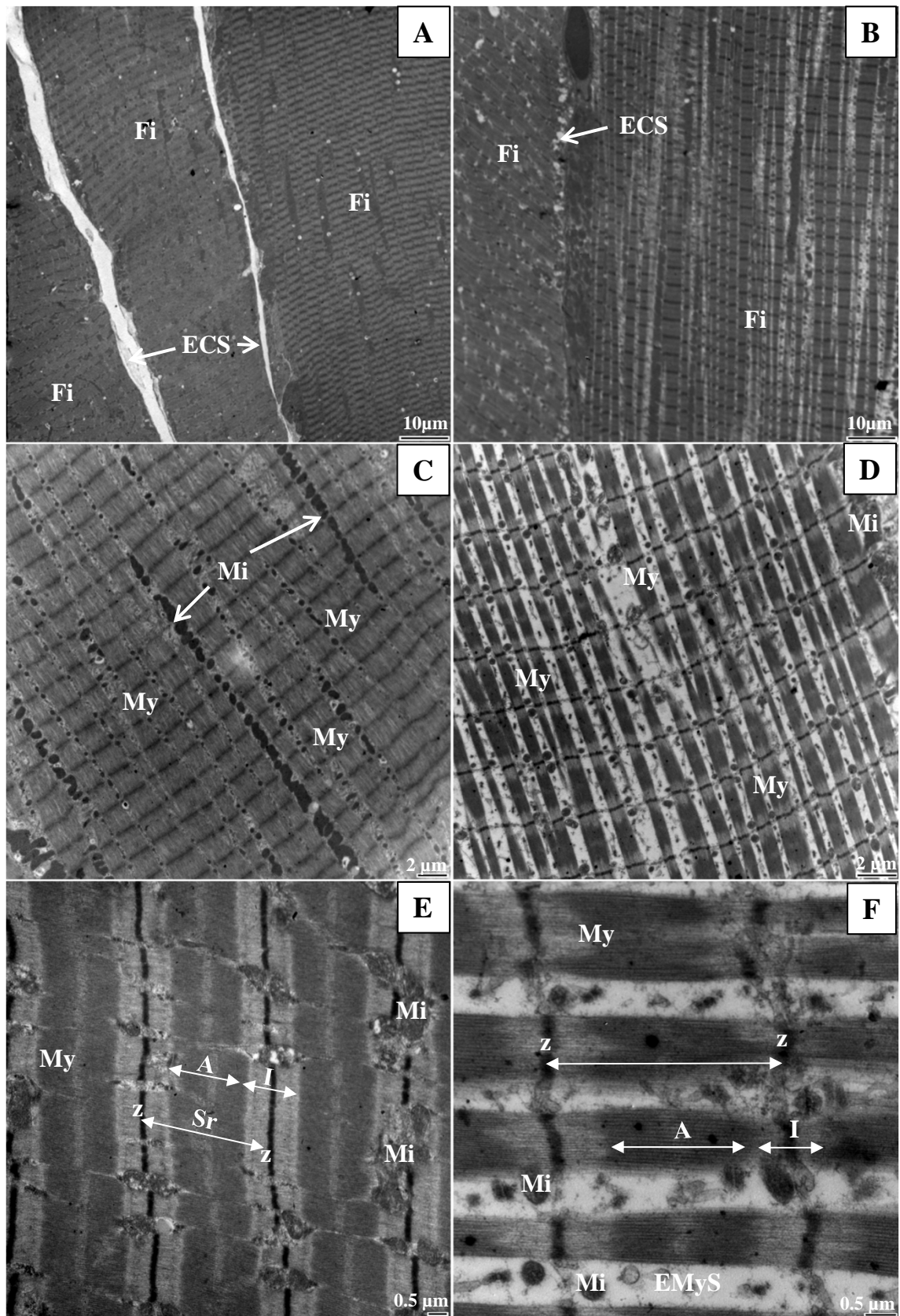


Figure 4.

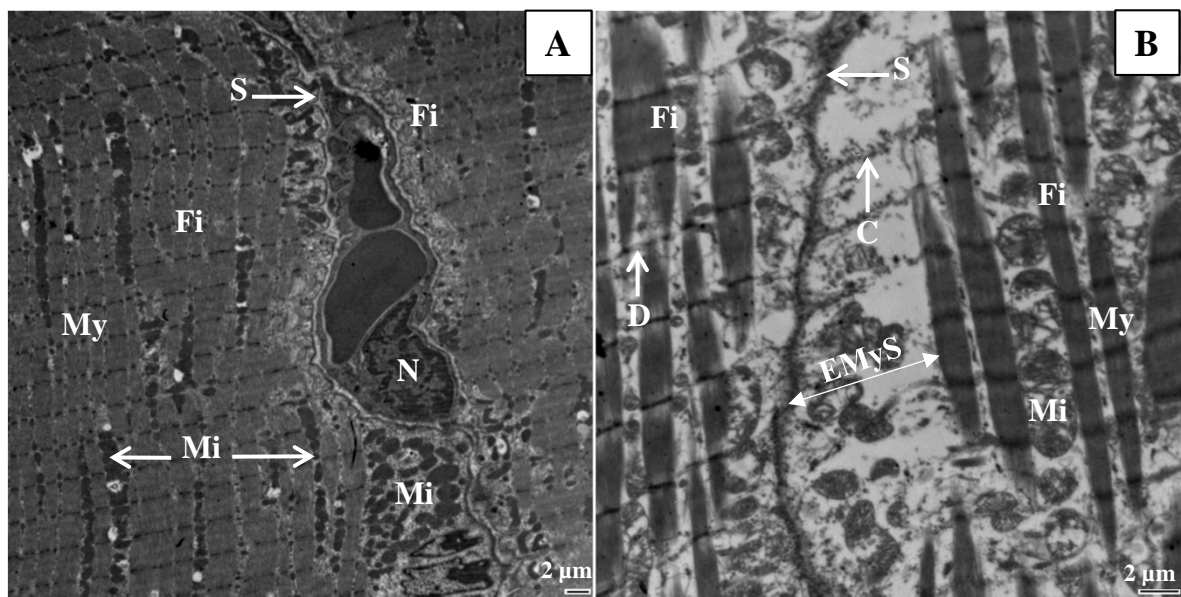


Figure 5.

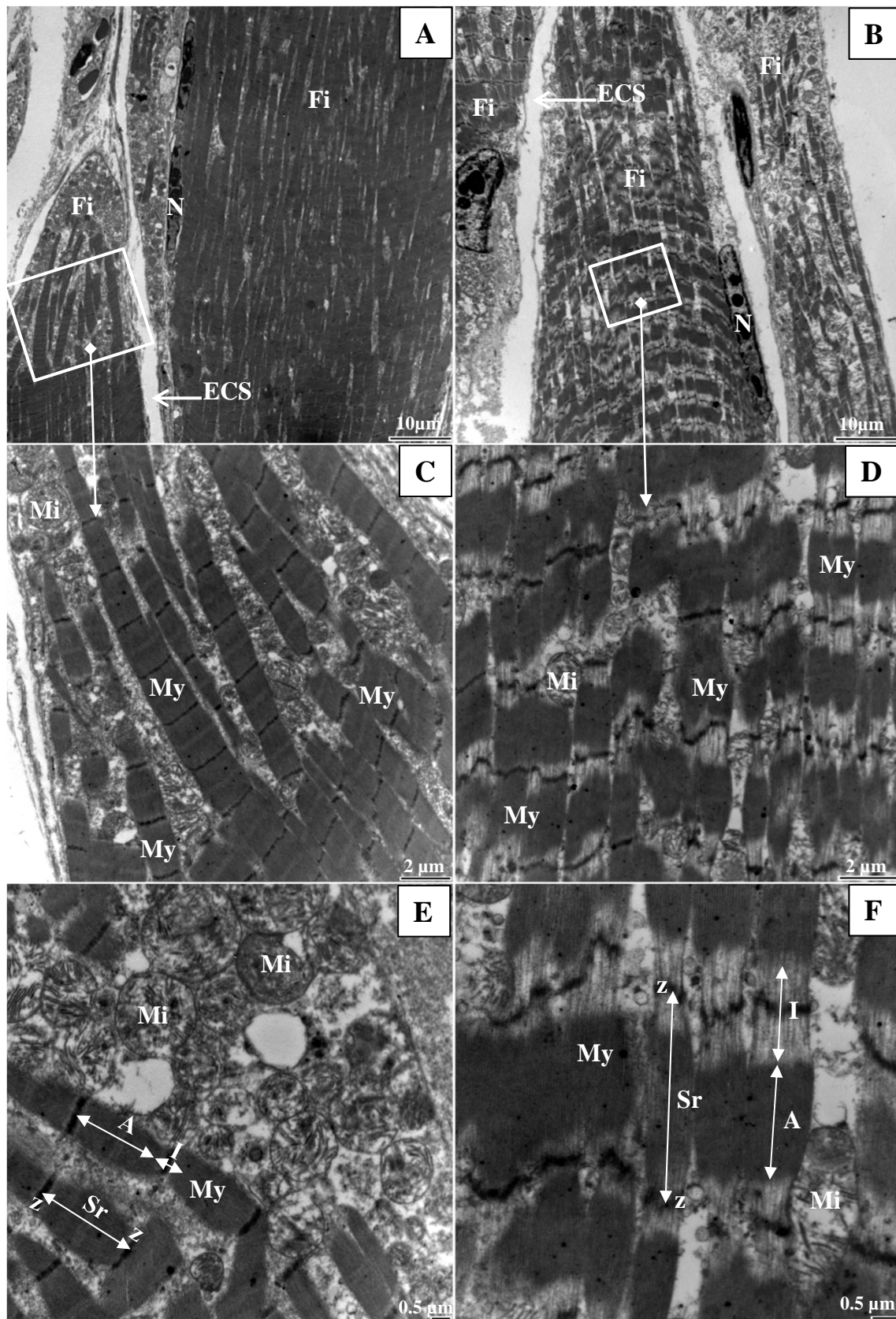


Figure 6.

Conclusion

Malgré l'absence d'un phénotype macroscopique très marqué chez les souris KO HspB1, nous avons mis en évidence au niveau microscopique un rôle crucial de la protéine Hsp27 dans l'ultrastructure du muscle. En effet, Cette étude montre aussi pour la première fois une désorganisation de l'ultrastructure des muscles de souris KO HspB1 suggérant une fragilité de l'architecture des myofibrilles. Ceci pourrait résulter de l'action d'un ensemble de phénomènes biologiques divers comme l'apoptose, la protéolyse et la fragilité du cytosquelette musculaire chez les KO HspB1. L'ensemble des résultats de l'ultrastructure seront validés ultérieurement sur le muscle *Tibialis anterior* afin de déterminer l'effet de l'inactivation du gène HspB1 en fonction du muscle. Ce modèle permettra d'explorer les mécanismes moléculaires dans lesquels la Hsp27 joue un rôle crucial. C'est l'objet des publications 3 et 4.

Article III : Kammoun et al.

publié dans

«Computational and Structural Biotechnology Journal»

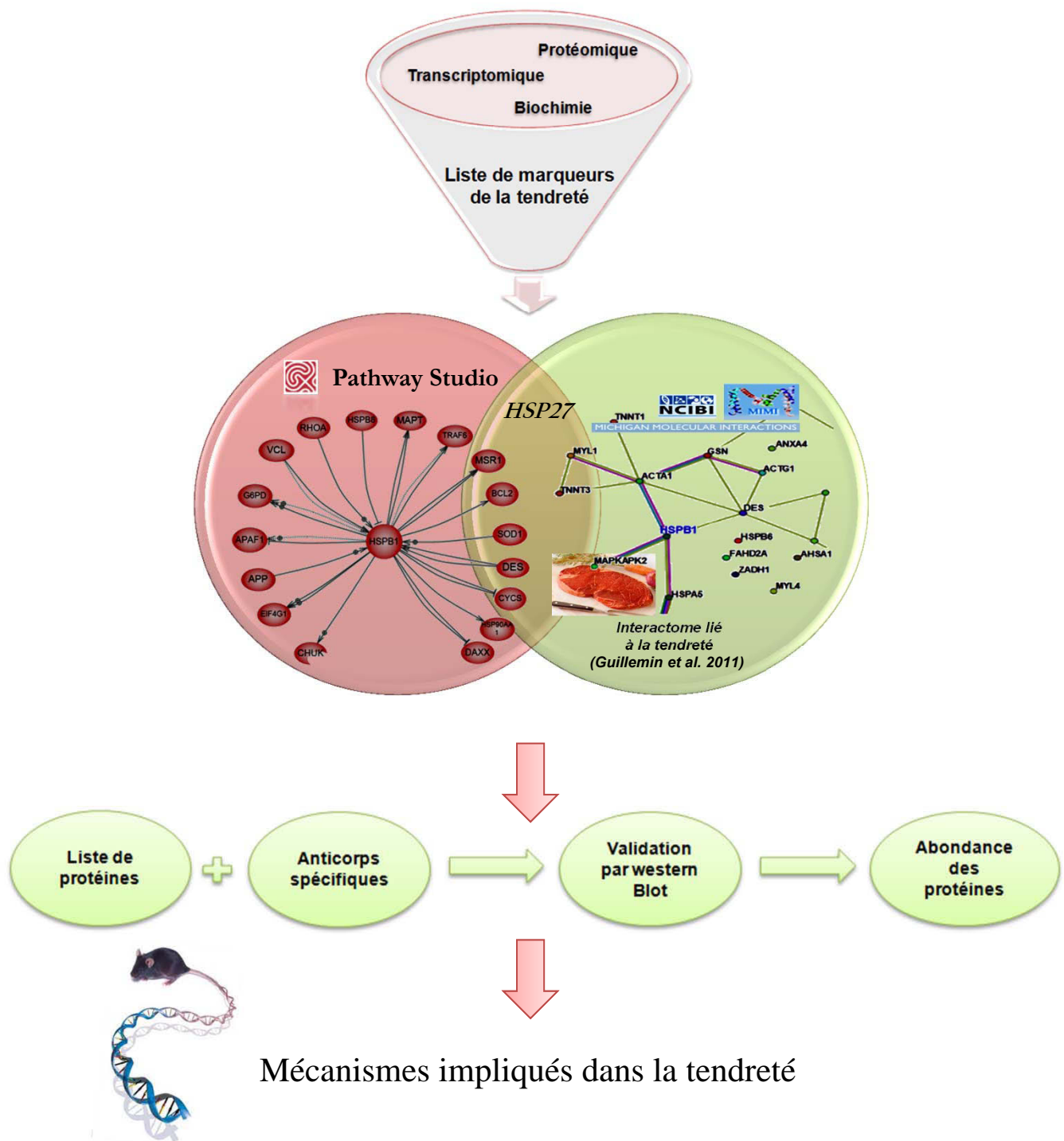


Figure 19. Stratégie d'analyse bioinformatique pour prédire les interacteurs de Hsp27 impliqués dans la tendreté

Article III: A network-based approach for predicting Hsp27 knock-out targets in mouse skeletal muscles.

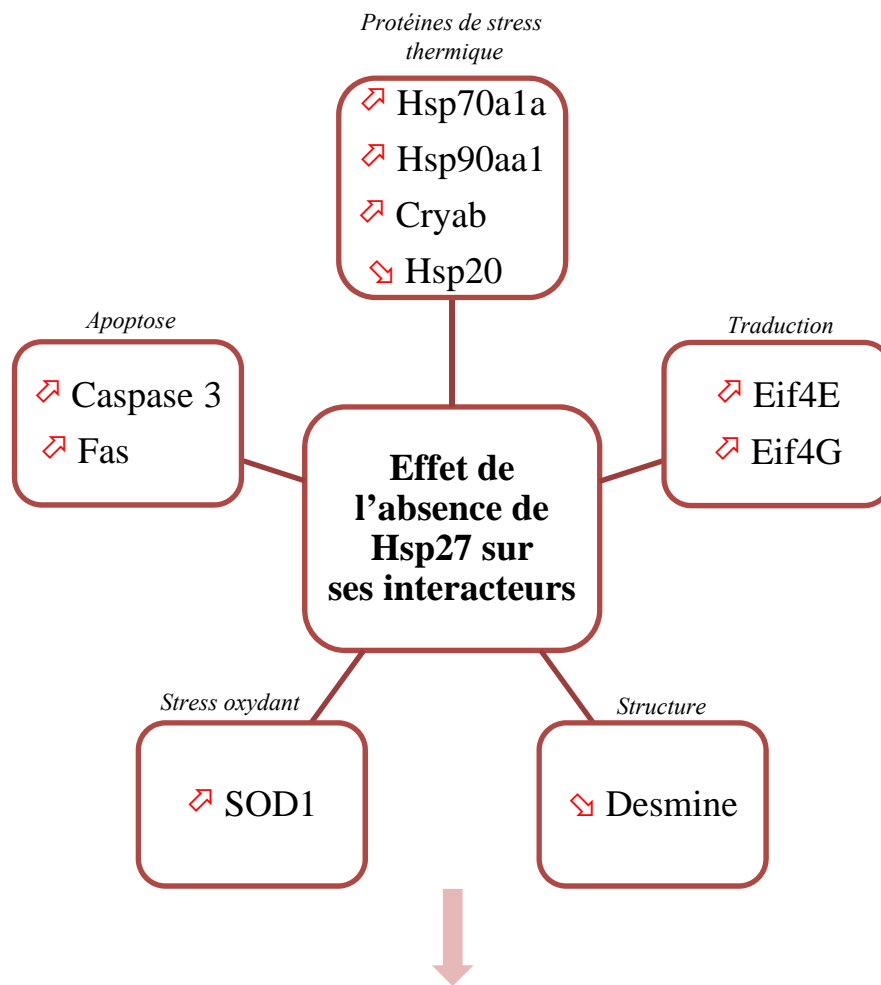
Kammoun M. Picard B. Henry-Berger J. Cassar-Malek I.

Introduction

Les recherches réalisées au sein de l'équipe Amuvi avaient permis d'établir une première liste une liste de 24 marqueurs potentiels de la tendreté de la viande. Dans le but d'approfondir les connaissances sur la fonction biologique des différents marqueurs de cette liste, une analyse bio-informatique avait été réalisée au cours d'une thèse précédente. Elle a permis d'établir un interactome qui fait le lien entre les différents marqueurs protéines (Guillemin *et al.*, 2011a). Dans cet interactome, des Heat Shock Proteins (Hsps), en particulier la Hsp27, étaient retrouvés à des « carrefours » biologiques.

Pour comprendre le rôle de Hsp27 dans le mécanisme de la tendreté, nous avons généré une lignée de souris présentant une inactivation de HspB1 (Publication 2). L'objectif de la présente étude était d'analyser les conséquences de l'absence de Hsp27 sur l'abondance des autres protéines musculaires liées à la tendreté de la viande. Ces protéines ont été recherchées et sélectionnées par une approche bio-informatique, puis leur abondance a été analysée par une approche biochimique. La combinaison des deux approches nous a permis de mieux caractériser le phénotype musculaire des souris KO HspB1 d'un point de vue moléculaire. Une telle approche est originale et exploite les données expérimentales contenues dans les bases de données internationales (Figure 19).

L'étude repose sur la liste initiale de vingt-quatre protéines identifiées comme marqueurs potentiels de la tendreté de la viande bovine. Ce jeu de données de base rassemble des protéines issues de différentes familles : métabolisme musculaire, structure, résistance au stress oxydatif, protéolyse et protéines du stress thermique (Hsps) (Guillemin *et al.*, 2011a). L'étude bio-informatique a été réalisée à l'aide du logiciel Pathway-Studio (Ariadne Genomics) qui permet d'intégrer les données issues de la bibliographie aux données expérimentales et de construire des réseaux d'interaction. La démarche a consisté à construire un réseau d'interacteurs centré sur Hsp27 (proches voisins en interaction directe). L'intersection entre la liste des protéines de ce réseau et la liste des 330 protéines issues de l'analyse de Guillemin *et al.* (2011a) a été ensuite réalisée pour établir une liste de protéines cibles potentielles de l'absence de Hsp27. Cette liste a été ensuite validée par Western-blotting.



Hsp27 est en interaction avec différentes protéines impliquées dans différents mécanismes biologiques
L'invalidation du gène HspB1 suggère:

- Une adaptation à l'absence de la Hsp27 par des changements compensatoires dans l'expression d'autres chaperonnes.
- Une stimulation de la voie apoptotique par l'intermédiaire des effecteurs de l'apoptose et des facteurs de traduction.
- Un rôle primordial de la Hsp27 dans l'organisation de la structure musculaire. L'interaction avec la Desmine est en relation avec l'ultrastructure musculaire et son évolution *post-mortem*.
- Un rôle protecteur de la Hsp27 contre le stress oxydant.

Figure 20. Effet de l'invalidation du gène HspB1 sur l'abondance de ces interacteurs dans le muscle *Soleus*

- ↗ Augmentation de l'abondance
- ◻ Diminution de l'abondance

Résumé

L'approche bio-informatique a révélé une liste de 17 protéines en interaction directe avec Hsp27 dont les abondances ont été mesurées au niveau des muscles de souris KO HspB1. Les interacteurs de Hsp27 appartenaient à cinq grandes familles : les Protéines de choc thermique (Hsp20, Cryab, Hsp70a1a et Hsp90aa1), les facteurs pro / anti-apoptotiques (Fas, Chuk, et Caspase 3), les facteurs de traduction (EIF4E et Eif4G1), les protéines du cytosquelette (Desmine) et antioxydants (Sod1) (Figure 20). Nous avons observé une modification de l'abondance de la plupart des protéines cibles de Hsp27 et principalement dans le muscle le plus oxydatif. Ainsi, cette étude démontre les liens fonctionnels entre Hsp27 et ses interacteurs directs. L'invalidation de la protéine Hsp27 semble affecter d'avantage le muscle oxydatif que le muscle glycolytique. Cet effet muscle spécifique pourrait être en relation avec l'abondance plus importante de cette dernière dans les muscles oxydatifs par rapport aux muscles glycolytiques.

A NETWORK-BASED APPROACH FOR PREDICTING HSP27 KNOCK-OUT TARGETS IN MOUSE SKELETAL MUSCLES

Malek Kammoun ^{a,b}, Brigitte Picard ^{a,b}, Joëlle Henry-Berger ^c, Isabelle Cassar-Malek ^{a,b,*}

Abstract: Thanks to genomics, we have previously identified markers of beef tenderness, and computed a bioinformatic analysis that enabled us to build an interactome in which we found Hsp27 at a crucial node. Here, we have used a network-based approach for understanding the contribution of Hsp27 to tenderness through the prediction of its interactors related to tenderness. We have revealed the direct interactors of Hsp27. The predicted partners of Hsp27 included proteins involved in different functions, e.g. members of Hsp families (Hsp20, Cryab, Hsp70a1a, and Hsp90aa1), regulators of apoptosis (Fas, Chuk, and caspase-3), translation factors (Eif4E, and Eif4G1), cytoskeletal proteins (Desmin) and antioxidants (Sod1). The abundances of 15 proteins were quantified by Western blotting in two muscles of HspBI-null mice and their controls. We observed changes in the amount of most of the Hsp27 predicted targets in mice devoid of Hsp27 mainly in the most oxidative muscle. Our study demonstrates the functional links between Hsp27 and its predicted targets. It suggests that Hsp status, apoptotic processes and protection against oxidative stress are crucial for *post-mortem* muscle metabolism, subsequent proteolysis, and therefore for beef tenderness.

2ND INTERNATIONAL CONFERENCE ON LIFE SCIENCE & BIOLOGICAL ENGINEERING

Introduction

Tenderness, flavour, juiciness, and marbling are very important attributes in the determination of beef quality even if payment on the basis of beef quality exists only in Australia at this moment. Among these attributes, there is specific attention to tenderness, which is the top priority quality attribute in beef [1]. A better control of beef tenderness is of major importance for beef producers and retailers in order to satisfy the consumers' requirement for a consistently satisfactory product [2]. For this reason, the beef industry is looking for biological markers that would identify live animals with desirable quality attributes, in order to orientate them towards the most appropriate production systems. However, tenderness is highly variable partly due to the nature of muscle, which is a complex biological structure, consisting of fibres, adipocytes and connective tissue with different properties [3,4]. Tenderness is also highly dependent on mechanisms occurring during the *post-mortem* transformation of muscle [5].

Transcriptomic and proteomic studies including ours [6,7] have attempted to identify gene affecting phenotypic differences for tenderness in cattle using high-density microarrays and two-dimensional electrophoresis [6]. They have identified some potential biological markers of beef tenderness in different production systems. These biomarkers are involved in a lot of different cellular pathways such as muscle contraction, stress reactions, glycolysis and apoptosis [8]. In order to further understand the functional relationships

between these markers that may participate in controlling tenderness, we computed a bioinformatic analysis [9]. It allowed the construction of a first "tenderness network" consisting of 330 proteins based on 24 initial biomarkers of beef tenderness. In this network, heat shock proteins and especially the Hsp27 were found at crucial nodes [9]. Hsp27 is encoded by the HspBI gene and belongs to the small heat shock family also called Hsp20 family, comprising the Hsp20, Hsp27, and $\alpha\beta$ -crystallin. Interestingly, several studies have shown that Hsp27 expression is correlated with tenderness and could be used as a tenderness biomarker [6,10-12]. Its role in tenderness could be achieved partly through apoptosis and be correlated with its phosphorylation and oligomeric size [13].

Hence, the aim of the present study was to analyze the consequences of the targeted invalidation of the HspBI gene on the proteins interacting with Hsp27 and linked to beef tenderness. We performed a network analysis to reveal the partner proteins of Hsp27. Then, we analyzed their abundance in the muscle of HspBI-null mice and their controls. The study enabled the identification of several pathways potentially involved in the determination of tenderness.

Materials and methods

Bio-informatics

The first part of the work was devoted to the identification of proteins that interact with Hsp27 according to information stored and shared in bioinformatic databases. This was performed using the software for systems biology Pathway Studio (Ariadne Genomics). Pathway Studio helps to interpret experimental data in the context of pathways, gene regulation networks, protein interaction maps, and to automatically update pathways with newly published facts using MedScan technology (www.elsevier.com). The Medscan reader extracts the relationship information from literature. We used the ResNet Mammalian (human, rat and mouse) database which contained the latest information extracted from the literature and

^aINRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

^bClermont University, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France

^cUMR CNRS - Blaise Pascal University 6547, F-63177 Aubière Cedex, France

* Corresponding author.

E-mail address: isabelle.cassar-malek@clermont.inra.fr (Isabelle Cassar-Malek)

Table 1. Suppliers and conditions for each antibody used in this study.

Target protein	Protein name	Primary antibody type	References	Dilution
Hsp27	Heat shock protein 27	Monoclonal	Santa Cruz: SC13132	1/1000
Hsp20	Heat shock protein 20	Monoclonal	Santa Cruz: SC51955	1/200
Cryab	Crystallin, alpha B	Monoclonal	Enzo: SPA-222	1/2000
Hspbap1	Heat shock protein 27-associated protein 1	Polyclonal	Santa Cruz: SC-99444	1/4000
Hsp40	Heat shock protein 40	Monoclonal	Santa Cruz: SC-56400	1/400
Hsp70a1a	Heat shock protein 70 1A	Monoclonal	R&D Systems: #242707	1/500
Hsp90aa1	Heat shock protein 90-alpha	Monoclonal	R&D Systems: #341320	1/500
Fas	Tumour necrosis factor receptor superfamily member 6, TRAF6	Polyclonal	R&D Systems: #AF 435	1/500
Chuk	Inhibitor of nuclear factor Kappa-B kinase subunit alpha	Polyclonal	Tebu-bio: E11-0441A	1/1000
Sod1	Superoxide dismutase	Polyclonal	ACRIS: APO3021PU-N	1/2000
Casp3	Caspase-3	Polyclonal	Santa Cruz: SC-7148	1/500
Cyts	Cytochrome c	Polyclonal	Tebu-bio: PAB 8027	1/10000
Eif4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E	Monoclonal	R&D Systems: clone 299910	1/250
Eif4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Monoclonal	Tebu-bio: H00001981-M10	1/1000
Des	Desmin	Monoclonal	DAKO: D33 M0760	1/250

from published high-throughput experiments. The approach was to build a network centred on Hsp27 interactors also called nearest neighbours. The filter options used were “protein” as entity type and “regulation” and “direct regulation” as applicable relation types. Then, the intersection between the Hsp27 neighbours and the list of 330 proteins from a previous tenderness network [9] was computed to get a list of Hsp27 interactors putatively linked to tenderness.

Animals and experimental procedure

In this study we used a constitutive knock out by gene deletion of HspBI in mice (HspBI-null mice. This was achieved through targeted insertion (homologous recombination) as described in Kammoun *et al.* [14]. About 100 % of the HspBI coding sequence gene was replaced by bacterial vector obtained from BMQ BAC library (Mouse Micer vector set 369N20). The commercial heterozygous ES cells (HspBI ^{-/+}) were microinjected into the blastocoels of mouse embryos. Embryos that received ES cells were then implanted into surrogate mothers. The resulting chimeras with a high percentage of agouti coat color were mated to wild type C57BL/6 mice to generate F1 offspring. All experiments using homozygous (HspBI ^{+/+}), heterozygous (HspBI ^{-/+}), or HspBI homozygous null mice (HspBI ^{-/-}) were performed on C57BL/6 background. The F2 offspring were mated in order to amplify the three strains. Mice were housed at the experimental plant of nutrition and microbiology of the National Institute of Agronomic Research (INRA-France), in a temperature and humidity controlled room under a 12-hour light and dark cycle. They were fed *ad libitum*. Ten males were selected to constitute 2 experimental groups. Experimental procedures and animal holding respected French animal protection legislation, including licensing of experimenters. They were controlled and approved by the French Veterinary Services (agreement number CE 84-12).

Muscle samples

The HspBI-null mice were sacrificed at 12 weeks postnatal. Two muscles with different composition in fibre types were collected,

namely the m. *Soleus* (slow oxidative) and the m. *Tibialis Anterior* (fast glycolytic) [15]. Muscle samples were taken immediately after sacrifice, frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until protein extraction. Total protein extractions were performed according to Bouley *et al.* [16] in a denaturation/extraction buffer (8.3 M urea, 2 M thiourea, 1% DTT, 2% CHAPS) and stored at -20°C until use. The protein concentration was determined by spectrophotometry with the Bradford assay [17].

Immunological protein quantification

The conditions for use and specificity of primary antibodies against candidate proteins were assessed by Western blotting in order to check the specificity of all the antibodies. An antibody was considered specific when its target bands were detected at the expected molecular weight. Fourteen primary antibodies were tested for their specificity and their optimal dilution ratios were determined. Conditions used and suppliers for all primary antibodies are reported in Table I. Secondary fluorescent-conjugated IRDye 800CW antibodies were supplied by LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA) and used at 1/20000.

The abundance of candidate proteins was measured by Western blotting in the m. *Soleus* and the m. *Tibialis Anterior* of HspBI-null mice vs their control littermates. Fifteen µg of proteins were separated by gel electrophoresis using SDS-PAGE for 2 hr according to the Laemmli method [18]. After migration, the proteins were transferred onto PVDF transfer membrane Millipore (Bedford, MA01730, USA). Membranes were then blocked with 5% non-fat milk in TBST x buffer containing (blocking solution) and incubated under gentle agitation all night at room temperature in the presence of the primary antibodies. Then the membranes were incubated at 37°C for 30 minutes with the secondary fluorochrome-conjugated LICOR-antibody. Infrared fluorescence detection was then used for protein quantification. Membranes were scanned by the scanner Odyssey (LI-COR Biosciences) at 800 nm. Band volumes were quantified in the images using ImageQuant TL v 7.0.1.0 software (Amersham). Protein abundance for each sample is given in arbitrary units.

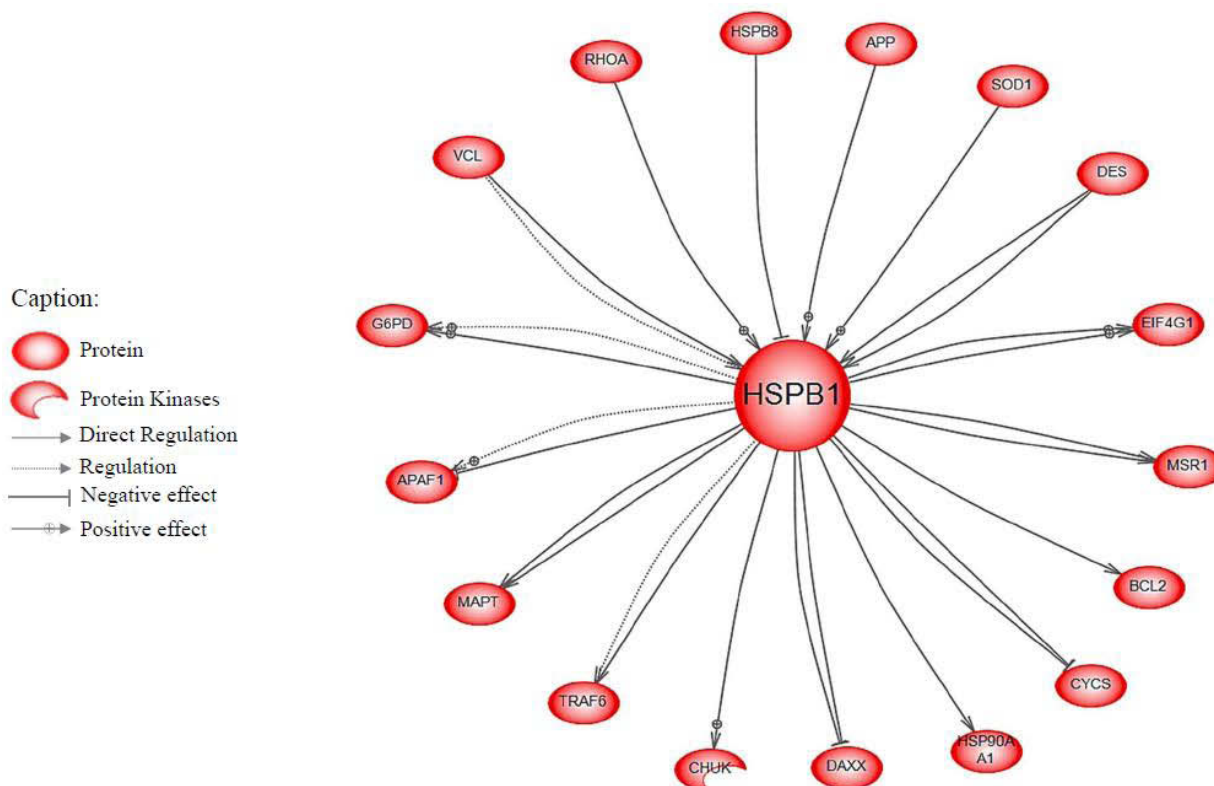


Figure 1. Network of the intersection between Hsp27 neighbours (HspB1 gene) and the 330 proteins of the tenderness interactome [11]. The protein names are presented in Table 2. The network was built using Pathway Studio. The filter options are: *protein* as an applicable entity type, *regulation* and *direct regulation* as applicable relation types.

Statistical analysis

The differences in muscle protein abundance between HspBI-null mice ($n=5$) and their controls ($n=5$) were assessed by analysis of variance (ANOVA) using XLSTAT Software [19]. The effects tested in the model included muscle (M), genotype (G), and muscleXgenotype interaction (MXG). Results are expressed as the LS-mean \pm standard error of mean (SEM). A difference between groups was considered significant when $P < 0.05$.

Results

Network analysis

The first step of our study was to build a network of the Hsp27 nearest neighbours (direct interactors) using the Pathway Studio software according to the information stored and shared in bioinformatics databases of mammalian experiments. As shown in Table 2, the network comprised 34 proteins predicted as direct interactors of Hsp27, but was not a hub in the tenderness network [9]. A gene ontology analysis indicated that these proteins belonged to different biological processes such as the response to heat, apoptotic process, and response to oxidative stress.

As the initial Hsp27 network was built independently of tenderness, we performed an intersection between both networks to keep the Hsp27 interactors potentially linked to beef tenderness. Thus we compared the list of the Hsp27 neighbours with the 330 proteins of the tenderness network. The proteins in common (intersection) were then subjected to Pathway Studio analysis. This led to a second network of 17 proteins directly interacting with Hsp27 (Figure 1). The Heat shock protein 22 (Hspb8) and Heat shock protein 90 (Hsp90aa1) were the only heat shock proteins

found in this network. Five proteins involved in apoptosis were also identified (Cytochrome c, Apoptosis regulator Bcl-2, TNF receptor-associated factor 6, Death domain-associated protein 6, and Apoptotic protease-activating factor 1). Some proteins (e.g. Vinculin, Desmin, Amyloid beta A4 protein, Transforming protein A, and Microtubule-associated protein) were related to muscle contraction and structure. Two other groups of proteins included anti-oxidants (Superoxide dismutase and Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase) and proteins involved in cellular metabolism (Macrophage scavenger receptor types I, Eukaryotic translation initiation factor gamma I, and the Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha).

In conclusion, the network approach predicted that 17 of the 34 interactors of Hsp27 may be related to meat tenderness (Figure 1). These proteins belonged to different biological families (Heat shock proteins, apoptosis, cell protein metabolism, structure, and response to oxidative stress).

Validation of a set of the Hsp27 predicted targets

Depending on the availability of antibodies, the abundances of 15 proteins including 12 out of these 17 interactors, the Hsp40/DnaJ1 (a patented marker of beef toughness [54]), the Hsp70 (a well-known Hsp27 co-chaperone [55]), and Hsp27 were compared between the HspBI-null mice and control ones. As expected, the Hsp27 protein was not detectable in the muscles of the HspBI-null mice (Table 3). The statistical analysis showed a significant effect of muscle for all proteins except Hsp40, Cysc, and Eif4E, of genotype for all proteins except Hsp40, Chuk, Hspbap1 and Caspase3 (Table 3). A muscle x genotype interaction was detected for Cryab ($P < 0.1$), Hspbap1 ($P < 0.1$), Hsp70a1a ($P < 0.05$), Sod1 ($P < 0.1$), Casp3 ($P < 0.001$), Eif4G1 ($P < 0.05$), and Desmin ($P < 0.1$) (Table 3).

Table 2. Protein names, gene names and references in *Mus musculus* of 34 nearest neighbours of Hsp27.

Protein	Protein name	Protein ID <i>SWISSPROT</i>	Gene	Gene ID <i>NCBI</i>	Gene Ontology	References
Hspb6	Heat shock protein 20	Q5EBG6	hspb6	243912	Regulation of muscle contraction	[20]
Hspb8	Heat shock protein 22	Q9JK92	hspb8	80888	Response to stress	[21]
Hspb1	Heat shock protein 27	P14602	hspb1	15507	Regulation of apoptotic process	[22]
Hspbap1	Heat shock protein 27-associated protein 1	Q8BK58	hspbap1	66667	Response to stress	[23]
Hsp90aa1	Heat shock protein 90-alpha	A0PJ91	hsp90aa1	15519	Response to stress	[24]
Ins2	Insulin-2	P01326	ins2	16334	Regulation of apoptotic process	[25]
Vcl	Vinculin	Q64727	vcl	22330	Regulation of cell migration and adhesion	[26][30]
Des	Desmin	P31001	des	13346	Muscle development	[27]
Casp3	Caspase-3	P70677	casp3	12367	Regulation of apoptotic process	[28]
Cald1	Caldesmon1	Q8VCQ8	cald1	109624	Regulation of muscle contraction	[29]
Cyts	Cytochrome c	P62897	cyts	13063	Regulation of apoptotic process	[30]
Lalba	Alpha-lactalbumin	P29752	lalba	16770	Lactose biosynthetic process	[31]
Akt1	Protein kinase B alpha	P31750	akt1	11651	Regulation of apoptotic process	[32]
Sod1	Superoxide dismutase	P08228	sod1	20655	Muscle cell homeostasis	[33]
App	Amyloid beta A4 protein	P12023	app	11820	Regulation of mitotic cell cycle	[34]
fgf-2	Fibroblast growth factor 2	P15655	fgf-2	14173	Regulation of apoptotic process	[35]
Cdh1	Cadherin-1	P09803	cdh1	12550	Regulation of cell adhesion	[36]
Tnni3	Troponin I, cardiac muscle	P48787	tnni3	21954	Regulation of muscle contraction	[37]
Tnnt2	Troponin T, cardiac muscle	Q6P3Z7	tnnt2	21956	Regulation of muscle contraction	[38]
Bcl-2	Apoptosis regulator BCL-2	P10417	bcl-2	12043	Regulation of apoptotic process	[39]
Rhoa	Transforming protein RhoA	Q9QUI0	rhoa	11848	Muscle development	[40]
Traf6	TNF receptor-associated factor 6	P70196	traf6	22034	Regulation of apoptotic process	[41]
Diablo	Diablo homolog, mitochondrial	D3Z2Q3	diablo	66593	Regulation of apoptotic process	[42]
Nefl	Neurofilament light polypeptide	P08551	nefl	18039	Organization of the neurofilament	[43]
Daxx	Death domain-associated protein 6	O35613	daxx	13163	Regulation of transcription	[44]
Mapt	Microtubule-associated protein tau	P10637	mapt	17762	Regulation of microtubule polymerization	[45]
Dusp1	Dual specificity protein phosphatase 1	P28563	dusp1	19252	Regulation of apoptotic process	[46]
Msr1	Macrophage scavenger receptor types I	P30204	msr1	20288	Regulation of cholesterol storage	[47]
Apaf1	Apoptotic protease-activating factor 1	O88879	apaf1	11783	Regulation of apoptotic process	[48]
G6pdx	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Q00612	g6pdx	14381	Response to oxidative stress	[49]
Eif4e	Eukaryotic translation initiation factor 4E	P63073	eif4e	13684	Regulation of translation	[50]
Eif4g1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Q6NZJ6	eif4g1	208643	Regulation of translation	[51]
Fas	Tumour necrosis factor receptor superfamily member 6, TRAF6	P25446	fas	14102	Regulation of apoptotic process	[52]
Chuk	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha	A0AUV3	chuk	12675	I-kappaB phosphorylation	[53]

In the m. *Tibialis Anterior*, a lower abundance of the 17 kDa caspase-3 was detected in the HspBI-null mice (Table 3). A trend was observed for lower abundance of Hsp20 in the HspBI-null mice.

In the m. *Soleus* muscle, more differences were observed between HspBI-null mice and their controls than in the m. *Tibialis Anterior* (Table 3). The abundances of the Cryab, Hsp70a1a and Hsp90aa1 were higher and that of Hsp20 was lower in the HspBI-null mice. Abundances of the 17 kDa Caspase-3, and Fas were higher and Cyts

was lower in the HspBI-null mice than in controls. The abundance of the translation factors Eif4E and Eif4G1 was higher in HspBI-null mice than in controls ($P<0.05$ and $P<0.01$, respectively). Lastly, Sod1 was higher ($P<0.05$) and Desmin was lower ($P<0.01$) in the HspBI-null mice.

In conclusion, we observed changes in the amount of most of the Hsp27 predicted targets in the HspBI-null mice. These changes were more marked in the oxidative muscle.

Table 3. Abundance of Hsp27 interactors in the m. *Tibialis Anterior* and m. *Soleus* of mice.

Protein	<i>m. Tibialis Anterior</i>		<i>m. Soleus</i>		SEM	Significance of effect
	<i>HspB1-null mice</i>	<i>Control mice</i>	<i>HspB1-null mice</i>	<i>Control mice</i>		
Hsp27	0	51879 ^b	0	114175 ^a	3525	M ^{***} , G ^{***} , MxG ^{***}
Hsp20	156240 ^{ab}	185010 ^a	98369 ^b	178891 ^a	12984	M ^t , G ^t
Cryab	450204 ^c	329197 ^c	6731013 ^a	4918470 ^b	344702	M ^{***} , G ^t , MxG ^t
Hspbap1	118207 ^a	128968 ^a	60568 ^b	45241 ^b	4864	M ^{***} , MxG ^t
Hsp40	24857 ^a	26989 ^a	24529 ^a	16046 ^a	2727	-
Hsp70a1a	16977 ^c	8980 ^c	357462 ^a	268393 ^b	7658	M ^{***} , G ^t , MxG ^t
Hsp90aa1	23363 ^b	13718 ^b	46043 ^a	22752 ^b	3020	M ^t , G ^{**}
Fas	103957 ^a	88394 ^a	48383 ^b	27529 ^c	4551	M ^{***} , G ^t
Chuk	57503 ^a	55918 ^a	13081 ^b	17995 ^b	1859	M ^{***}
Sod1	797670 ^a	782077 ^a	659073 ^b	532988 ^c	25989	M ^{***} , G ^t , MxG ^t
17 kDa Casp3	36436 ^b	46469 ^a	35280 ^b	22977 ^c	1724	M ^{***} , MxG ^{***}
Cyts	1859951 ^{ab}	1930851 ^{ab}	1841464 ^b	2366463 ^a	112016	G ^t
Elf4E	26760 ^{ab}	23925 ^{ab}	30538 ^a	22413 ^b	1460	G ^t
Elf4G1	141750 ^c	128482 ^c	429500 ^a	333187 ^b	9464	M ^{***} , G ^{**} , MxG ^t
Desmin	106167 ^b	128907 ^b	150110 ^b	242959 ^a	15125	M ^{**} , G ^t , MxG ^t

The abundances of 15 Hsp27 interactors were measured by Western blotting.

The protein names are presented in Table 1. Protein abundance for each sample is given in arbitrary units.

^{a, b, c, d} LS-means with different superscripts within a row are significantly different ($P < 0.05$).

For Caspase-3, the 17 kDa fragment was quantified.

M: muscle effect; G: genotype effect; MxG: muscle and genotype interaction, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.0001$; t: tendency, $P < 0.1$

HspB1-null mice ($n=5$); control mice ($n=5$)

Discussion

Our previous studies have brought out Hsp27 as a beef quality biomarker [10,54,56-58]. However, the relationships between the expression of HspB1 (encoding Hsp27) and tenderness are not fully understood. A positive correlation of Hsp27 protein level and shear force value in Korean cattle was shown. Recent studies with French breeds confirm that correlation of Hsp27 level may be positive or negative depending on the cattle breed [10,59]. In order to understand Hsp27 function in muscle and its putative role in tenderness, we have used HspB1-null mice (devoid of Hsp27) as a model. Our strategy was to analyze the consequences of HspB1 targeted invalidation on the abundance of other muscle proteins related to beef tenderness. These proteins were investigated by a network-based approach that allowed a prediction of the effect of HspB1 knock-out. The prediction was borne out by a biochemical approach. Interestingly, 10 of 14 proteins were upregulated in the HspB1-null mice. The Hsp27 targets putatively related to tenderness belonged to five main protein families (Hsps, pro/anti-apoptotic factors, translation factors, cytoskeletal proteins, and antioxidants).

Hsp status

Firstly, the approach enabled the identification of six Hsps belonging to different groups, namely the small Hsp (Cryab, Hsp20, and Hspbap1), Hsp70, and Hsp90. The Hsp status was modified, except for Hspbap1 and Hsp40, in response to Hsp27 invalidation in the m. *Soleus*. This was not observed in the m. *Tibialis Anterior*. Hsps are ubiquitously expressed molecular chaperones that are

involved in the post translational folding of proteins. They promote the maturation, structural maintenance and proper regulation of specific target proteins involved for instance in cell cycle control and signal transduction. They interact dynamically with various co-chaperones that modulate their substrate recognition, ATPase cycle and chaperone function. They also play an important role in the anti-apoptotic pathway, in the inhibition of reactive oxygen species (ROS) formation and their chaperone activity ensures a good functioning of the muscle under constitutive oxidative stress conditions [60]. Cells usually overexpress Hsps in response to a multitude of insults (e.g. heat, oxidative stress, heavy metals, or cytotoxic agents among others) to prevent cell death and enable cells to survive under otherwise stressful and lethal conditions [61].

The abundance of Hsps is regulated by heat shock factors (Hsfs), the upstream transcriptional regulators of Hsps [62]. Among the Hsf family, Hsf1 is crucial for the heat shock response in mammalian organisms [63]. Under normal conditions, Hsf1 exists in a transcriptionally repressed state, associated to Hsp90 and Hsp70. The dissociation of Hsp90 and Hsp70 from Hsf1 under stress conditions leads to the activation of Hsf1. Then the monomeric Hsf1 trimerizes, phosphorylates and translocates to the nucleus where it transactivates the Hsp genes (e.g. Hsp27, Hsp70 and Hsp90) [61]. The existence of a negative feedback mechanism to return Hsf1 to its inactive monomeric state has been proposed [64]. Hsp27 exerts a feedback inhibition of Hsf1 transactivation [65]. Therefore, in the absence of Hsp27, Hsf1 would remain activated and the transcription of Hsp70 and Hsp90 genes would remain turned on. Accordingly, we showed higher abundance of Hsp70 (Hsp70a1a) and Hsp90 (Hsp90aa1) in the m. *Soleus* of HspB1-null mice. The abundance of

the related small heat shock protein Cryab increased. However, Hsp20 was down-regulated in the HspBI-null mice. Compared to the other Hsps, the expression of Hsp20 probably does not depend on the action of heat shock factor (Hsf1) [66].

Altogether, these data suggest that the HspBI-null mice could adapt to the loss of Hsp27 through compensatory changes in the muscle expression of cognate members of the Hsp family. Thus Hsp27 could also play a crucial role in orchestrating Hsp abundance under physiological and unstressed conditions. However, our data were not in accordance with Huang et al. [67], who did not observe any significant differences in the basal level of several Hsps (e.g. Hsp70, Hsp90, Hsp40, and Cryab) in the muscles after HspBI invalidation.

Regulation of apoptosis

In our study, some proteins involved in the regulation of apoptosis were also predicted as Hsp27 targets based on our network analysis. This was validated by Western blot analysis. We detected up-regulation of pro-apoptotic proteins (e.g. active caspase-3, and Fas) in the m. *Soleus* of HspBI-null mice. These data are in agreement with the well-known anti-apoptotic effects of Hsp27 [68] and more generally of members of the small Hsp family. Hsp27 protects the cells from apoptosis by concerning with Daxx, tBid, Cytochrome c, Ikk, Caspase-3 and etc. [66,69]. Some studies showed that overexpression of Hsp27 and Hsp20 prevents the cytochrome c activation of Caspase 9 and 3 playing a central role in the execution of apoptosis [70]. Reports have already mentioned decreased levels of procaspase-3 [71-73] in cells devoid of Hsp27. An interaction has been described between the pro-domain of procaspase-3 and Hsp27, which modulates procaspase-3 cleavage and activation [69]. Gibert et al. [74] proposed that Hsp27 could modulate procaspase-3 half-life. In the absence of Hsp27, procaspase-3 would be rapidly degraded through the ubiquitin/proteasome pathway. Accordingly, procaspase-3 tended to decrease in the m. *Tibialis Anterior* of the HspBI-null mice and was undetectable in their m. *Soleus* (data not shown).

Thus, our data suggest that the decrease in small Hsps (Hsp27 and Hsp20) with anti-apoptotic activity would increase apoptosis in the muscles of HspBI-null mice. Indeed, Hsp27 can interfere with the signals leading to apoptosis [66], at different stages of the apoptotic process (receptors, effectors, and inhibitors). Interestingly, the abundance of the inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha (Ikk- α , also known as Chuk) was decreased in the HspBI-null mice. Ikk- α is part of the IKB protein kinase complex. It is the predominant form of Ikk in the mammalian cells [75] that plays an important role in regulating the NF- κ B transcription factor activity. NF- κ B is present in the cytoplasm in an inactive form complexed with IKB that prevents its translocation to the nucleus where it binds to DNA and induces the transcription of a number of anti-apoptotic genes [76]. Activation of NF- κ B transcriptional activity has been proposed as another pathway providing for the anti-apoptotic effect of Hsp27 [66]. The phosphorylation of IKB by protein kinase promotes its ubiquitylation and proteasomal degradation. This process is enhanced by Hsp27, which forms tight complexes with ubiquitylated IKB and 26S proteasome and promotes its proteasomal degradation [66]. In our study, there were no elements to account for the reduction in Ikk- α in the absence of Hsp27.

Translation factors

Eif4E and Eif4G, two eukaryotic translation initiation factors were identified by the network approach. Their abundances were found to be increased in the m. *Soleus* of the HspBI-null mice. This was in favour of an increase in the availability of Eif4E (the principal

activator of cap-dependent translation) and Eif4G for protein translation. There are some data linking small Hsps to translation. Hsp27 specifically binds Eif4G during heat shock, preventing assembly of the cap-initiation/Eif4F complex and trapping Eif4G in insoluble granules [77] and/or promoting a more rapid recovery of translation initiation after stress [78]. Moreover, some studies have also shown that the overexpression of Eif4E rescues cells from apoptosis [79] by inhibiting the release of cytochrome c from the mitochondria. Bcl-XL has been found to be the mediator of Eif4E-dependent anti-apoptotic signaling upstream of mitochondria. In our study, the increased Eif4E (and Eif4G) could be part of a mechanism by which transcripts are translationally activated to mitigate the stimulation of the apoptotic pathway. Thereby, the cells could survive in the absence of Hsp27.

Regulation of the cytoskeleton

Small Hsps have been shown to be associated with the three major cytoskeletal components: microtubules, intermediate filaments and micro-filaments [80]. In our study, there was a significant decrease in the abundance of Desmin in the m. *soleus* of the HspBI-null mice. It was reported that Hsp27 protects Desmin from Calpain proteolysis [81]. Hsp20 also plays an important role in the protection of structural proteins like Desmin (intermyofibrillar cytoskeleton), Actin and Titin [9], and inhibits the formation of aggregates [82]. On the other hand, Panagopoulou et al. [83] demonstrate that Caspase mediated Desmin degradation and could act in parallel with Calpains which are known to be activated by TNF- α [84]. In the HspBI-null mice there was an increase in the abundance of TNF- α receptor associated factor (Fas) and caspase-3, which could lead to a decrease in Desmin abundance. This could have a consequence for the kinetics of *post-mortem* degradation of the ultra-structure of muscle detected in the HspBI-null mice (Kammoun *et al.*, submitted).

Protection against oxidative stress

Small heat shock proteins modulate the ability of the cells to respond to oxidative stress. For Hsp27 this effect includes a role in regulating enzymes such as the glucose-6-phosphate [80]. HspBI-null mice showed a significant increase in the abundance of the superoxide dismutase Sod1 in the m. *Soleus* compared to control mice. Sod1 is an enzyme that dismutates the superoxide anion and is involved in antioxidant defences [85]. Oxidative stress is accompanied by increased levels of toxic ROS, such as peroxides and free radicals. Overexpression of Hsp27 led to a significant decrease in basal levels of ROS and ROS production under conditions of oxidative stress [66]. In our study, the loss of Hsp27 could have led to increased basal ROS levels and subsequently to increased Sod1 levels protecting cells from antioxidant stress.

In conclusion, our study demonstrates the functional links between Hsp27 and its predicted targets as illustrated in mice devoid of Hsp27 under basal conditions (thermo neutrality, no physical or emotional stress). Particularly, changes in the abundance of these targets in HspBI-null muscles may be a mechanism to compensate for the absence of Hsp27. Our data also suggested that the apoptotic pathway may be stimulated in the HspBI-null mice through receptors, effectors, and inhibitors of apoptosis. This phenomenon being mediated by mitochondria, it may not be surprising to see the more dramatic effects in high mitochondrial content slow muscle. Additionally, Hsp27 seemed to modulate many elements of the cytoskeleton and would thus play an important role in the regulation of its dynamics and remodelling. All these elements are crucial for the tenderizing process. Based on these data, we can hypothesize that the *post-mortem* ageing and tenderizing process in beef could rely not

only on proteolysis but also on regulation of apoptotic processes, and protection against oxidative stress. In the future, integration of the knowledge gained from this study could finally result in optimizing meat production through detection of desirable animals. Moreover, the effect of Hsp27 loss was detected in the slow oxidative muscle (*Soleus*) rather than in the fast glycolytic muscle (*Tibialis Anterior*). This indicated that the invalidation of HspBI has muscle-specific effects probably in relation to the higher abundance of Hsps in the slow oxidative muscles. This is consistent with the weight assigned to Hsps in beef tenderness prediction in oxidative muscles [86].

Acknowledgements

We are grateful to Nicolas Allegre, Geneviève Gentes and Christiane Barboiron for their excellent technical support and advice. We also thank Florian Guillou, Denise Aubert and Véronique Blanquet for their helpful discussion.

Citation

Kammoun M, Picard B, Henry-Berger J, Cassar-Malek I (2013) A network-based approach for predicting Hsp27 knock-out targets in mouse skeletal muscles. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 6 (7): e201303008. doi: <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201303008>

References

- Geay Y, Bauchart D, Hocquette JF, Culioli J (2001) Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reproduction Nutrition Development* 41: 1-26. Erratum, 41, 377.
- Chriki S, Picard B, Jurie C, Reichstadt M, Micol D, et al. (2012) Meta-analysis of the comparison of the metabolic and contractile characteristics of two bovine muscles: Longissimus thoracis and semitendinosus. *Meat Science* 91: 423-429.
- Dransfield E, Martin JF, Bauchart D, Abouelkaram S, Lepetit J, et al. (2003) Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Animal Science* 76: 387-399.
- Picard B, Jurie C, Bauchart D, Dransfield E, Ouali A, et al. (2007) Muscle and meat characteristics from the main beef breeds of the Massif Central. *Sciences des Aliments* 27: 168-180.
- Paredi G, Raboni S, Bendixen E, de Almeida AM, Mozzarelli A (2012) "Muscle to meat" molecular events and technological transformations: the proteomics insight. *Journal of Proteomics* 75: 4275-4289.
- Picard B, Berri C, Lefaucheur L, Molette C, Sayd T, et al. (2010) Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Briefings in Functional Genomics* 9: 259-278.
- Bernard C, Cassar-Malek I, LeCunff M, Dubroeuq H, Renand G, et al. (2007) New Indicators of Beef Sensory Quality Revealed by Expression of Specific Genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5229-5237.
- Guillemin N, Jurie C, Cassar-Malek I, Hocquette J, Renand G, et al. (2011) Variations in the abundance of 24 proteins biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal* 6: 867 - 874.
- Guillemin N, Bonnet M, Jurie C, Picard B (2011) Functional analysis of beef tenderness. *Journal of Proteomics* 75: 352-365.
- Hocquette JF, Bernard-Capel C, Vidal V, Jesson B, Leveziel H, et al. (2012) The GENOTEND chip: a new tool to analyse gene expression in muscles of beef cattle for beef quality prediction. *BMC Veterinary Research* 8: (15 August 2012).
- Lomiwes D, Farouk MM, Wiklund E, Young OA Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: A review. *Meat Science*.
- Lomiwes D, Hurst SM, Dobbie P, Frost DA, Hurst RD, et al. (2013) The protection of bovine skeletal myofibrils from proteolytic damage post mortem by small heat shock proteins. Submitted.
- Paul C, Simon S, Gibert B, Virost S, Manero F, et al. (2010) Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27). *Experimental Cell Research* 316: 1535-1552.
- Kammoun M, Picard B, Cassar-Malek I (2011) Targeted invalidation of a gene bio-marker of beef tenderness in the mouse model. Second COST Action 925 Workshop.
- Bloemberg D, Quadrilatero J (2012) Rapid Determination of Myosin Heavy Chain Expression in Rat, Mouse, and Human Skeletal Muscle Using Multicolor Immunofluorescence Analysis. *Plos One* 7.
- Bouley J, Chambon C, Picard B (2004) Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4: 1811-1824.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Microsoft o (2013) XLSTAT Software In: Data analysis and statistics with MS Excel A, editor.
- Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, et al. (2011) A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474: 337-361.
- Garcia-Lax N, Tomas-Roca L, Marin F (2012) Developmental Expression Pattern of Hspb8 mRNA in the Mouse Brain: Analysis Through Online Databases. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 295: 492-503.
- Ke L, Meijering RAM, Hoogstra-Berends F, Mackovicova K, Vos MJ, et al. (2011) HSPB1, HSPB6, HSPB7 and HSPB8 Protect against RhoA GTPase-Induced Remodeling in Tachypaced Atrial Myocytes. *Plos One* 6.
- Liu CH, Gilmont RR, Benndorf R, Welsh MJ (2000) Identification and characterization of a novel protein from sertoli cells, PASS1, that associates with mammalian small stress protein hsp27. *Journal of Biological Chemistry* 275: 18724-18731.
- Imai T, Kato Y, Kajiura C, Mizukami S, Ishige I, et al. (2011) Heat shock protein 90 (HSP90) contributes to cytosolic translocation of extracellular antigen for cross-presentation by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 16363-16368.
- Stromer T, Ehrnsperger M, Gaestel M, Buchner J (2003) Analysis of the interaction of small heat shock proteins with unfolding proteins. *Journal of Biological Chemistry* 278: 18015-18021.
- Koshimizu T, Kawai M, Kondou H, Tachikawa K, Sakai N, et al. (2012) Vinculin Functions as Regulator of Chondrogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 287: 15760-15775.
- Li H, Choudhary SK, Milner DJ, Munir MI, Kuisk IR, et al. (1994) inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators myod and myogenin. *Journal of Cell Biology* 124: 827-841.
- Ghanem N, Andrusiak MG, Svoboda D, Al Lafi SM, Julian LM, et al. (2012) The Rb/E2F Pathway Modulates Neurogenesis through

- Direct Regulation of the Dlx1/Dlx2 Bigene Cluster. *Journal of Neuroscience* 32: 8219-8230.
29. Morin R, Team MGCP (2006) The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: The Mammalian Gene Collection (MGC) (vol 14, pg 2121, 2006). *Genome Research* 16: 804-804.
 30. Carlson SS, Mross GA, Wilson AC, Mead RT, Wolin LD, et al. (1977) primary structure of mouse, rat, and guinea-pig cytochrome-c. *Biochemistry* 16: 1437-1442.
 31. Prasad RV, Butkowski RJ, Hamilton JW, Ebner KE (1982) amino-acid-sequence of rat alpha-lactalbumin - a unique alpha-lactalbumin. *Biochemistry* 21: 1479-1482.
 32. Bellacosa A, Franke TF, Gonzalezportal ME, Datta K, Taguchi T, et al. (1993) structure, expression and chromosomal mapping of c-akt - relationship to v-akt and its implications. *Oncogene* 8: 745-754.
 33. Wei R, Bhattacharya A, Chintalaramulu N, Jernigan AL, Liu YH, et al. (2012) Protein misfolding, mitochondrial dysfunction and muscle loss are not directly dependent on soluble and aggregation state of mSOD1 protein in skeletal muscle of ALS. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417: 1275-1279.
 34. Bryson JB, Hobbs C, Parsons MJ, Bosch KD, Pandraud A, et al. (2012) Amyloid precursor protein (APP) contributes to pathology in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics* 21: 3871-3882.
 35. Kurtz A, Wang HL, Darwiche N, Harris V, Wellstein A (1997) Expression of a binding protein for FGF is associated with epithelial development and skin carcinogenesis. *Oncogene* 14: 2671-2681.
 36. Tanoue T, Takeichi M (2004) Mammalian Fat1 cadherin regulates actin dynamics and cell-cell contact. *Journal of Cell Biology* 165: 517-528.
 37. Oliveira SM, Zhang YH, Solis RS, Isackson H, Bellahcene M, et al. (2012) AMP-Activated Protein Kinase Phosphorylates Cardiac Troponin I and Alters Contractility of Murine Ventricular Myocytes. *Circulation Research* 110: 1192-1201.
 38. Lu D, Ma YW, Zhang W, Bao D, Dong W, et al. (2012) Knockdown of Cytochrome P450 2E1 Inhibits Oxidative Stress and Apoptosis in the cTnT(R141W) Dilated Cardiomyopathy Transgenic Mice. *Hypertension* 60: 81-89.
 39. Chand HS, Harris JF, Mebratu Y, Chen YD, Wright PS, et al. (2012) Intracellular Insulin-like Growth Factor-1 Induces Bcl-2 Expression in Airway Epithelial Cells. *Journal of Immunology* 188: 4581-4589.
 40. Ma XJ, Zhao Y, Daaka YH, Nie ZZ (2012) Acute Activation of beta(2)-Adrenergic Receptor Regulates Focal Adhesions through beta Arrestin2-and p115RhoGEF Protein-mediated Activation of RhoA. *Journal of Biological Chemistry* 287: 18925-18936.
 41. Mueck T, Berger F, Buechsler I, Valchanova RS, Landuzzi L, et al. (2011) TRAF6 regulates proliferation and differentiation of skeletal myoblasts. *Differentiation* 81: 99-106.
 42. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, et al. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102: 43-53.
 43. Gerhard DS, Wagner L, Feingold EA, Shenmen CM, Grouse LH, et al. (2004) The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: The Mammalian Gene Collection (MGC). *Genome Research* 14: 2121-2127.
 44. Yang XL, KhosraviFar R, Chang HY, Baltimore D (1997) Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89: 1067-1076.
 45. Bottiglieri T, Arning E, Wasek B, Nunbhakdi-Craig V, Sontag JM, et al. (2012) Acute Administration of L-Dopa Induces Changes in Methylation Metabolites, Reduced Protein Phosphatase 2A Methylation, and Hyperphosphorylation of Tau Protein in Mouse Brain. *Journal of Neuroscience* 32: 9173-9181.
 46. Charles CH, Abler AS, Lau LF (1992) cDNA sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein. *Oncogene* 7: 187-190.
 47. Wang WJ, He B, Shi W, Liang XL, Ma JC, et al. (2012) Deletion of scavenger receptor A protects mice from progressive nephropathy independent of lipid control during diet-induced hyperlipidemia. *Kidney International* 81: 1002-1014.
 48. Ferraro E, Pesaresi MG, De Zio D, Cencioni MT, Gortat A, et al. (2011) Apaf1 plays a pro-survival role by regulating centrosome morphology and function. *Journal of Cell Science* 124: 3450-3463.
 49. Ko CH, Li KR, Li CL, Ng PC, Fung KP, et al. (2011) Development of a novel mouse model of severe glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficiency for in vitro and in vivo assessment of hemolytic toxicity to red blood cells. *Blood Cells Molecules and Diseases* 47: 176-181.
 50. Furic L, Rong LW, Larsson O, Koumakpayi IH, Yoshida K, et al. (2010) eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 14134-14139.
 51. Hu SI, Katz M, Chin S, Qi XQ, Cruz J, et al. (2012) MNK2 Inhibits eIF4G Activation Through a Pathway Involving Serine-Arginine-Rich Protein Kinase in Skeletal Muscle. *Science Signaling* 5.
 52. Swargiary SS, Medhi S, Deka M, Kar P (2008) Study of regulatory polymorphism of TNF ligand and receptor superfamily, member 6 in HCV related liver diseases. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 23: A32-A33.
 53. Connelly MA, Marcu KB (1995) CHUK, a new member of the helix-loop-helix and leucine zipper families of interacting proteins, contains a serine threonine kinase catalytic domain. *Cellular & Molecular Biology Research* 41: 537-549.
 54. Bernard C, Cassar-Malek I, Le Cunff M, Dubroeuq H, Renand G, et al. (2007) New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5229 - 5237.
 55. Gobbo J, Gaucher-Di-Stasio C, Weidmann S, Guzzo J, Garrido C (2011) Quantification of HSP27 and HSP70 molecular chaperone activities. *Methods Mol Biol* 787: 137-143.
 56. Morzel M, Terlouw C, Chambon C, Micol D, Picard B (2008) Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Science* 78: 297-304.
 57. Kim N, Cho S, Lee S, Park H, Lee C, et al. (2008) Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Science* 80: 1068-1073.
 58. Hocquette JF, Botreau R, Picard B, Jacquet A, Pethick DW, et al. (2012) Opportunities for predicting and manipulating beef quality. *Meat Science* 92: 197-209.
 59. Picard B, Hocquette JF, Cassar-Malek I (2010) Marqueurs biologiques de la qualité sensorielle des viandes bovines. In: Bauchart D, Picard B, editors. *Muscle et viande de ruminant: Quae*. pp. 143-150.
 60. Kaul SC, Deocaris CC, Wadhwa R (2007) Three faces of mortalin: A housekeeper, guardian and killer. *Experimental Gerontology* 42: 263-274.
 61. Xia Y, Rocchi P, Iovanna JL, Peng L (2012) Targeting heat shock response pathways to treat pancreatic cancer. *Drug Discovery Today* 17: 35-43.

62. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11: 545-555.
63. Shamovsky I, Nudler E (2008) New insights into the mechanism of heat shock response activation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 855-861.
64. Pirkkala L, Alastalo TP, Zuo XX, Benjamin IJ, Sistonen L (2000) Disruption of heat shock factor 1 reveals an essential role in the ubiquitin proteolytic pathway. *Molecular and Cellular Biology* 20: 2670-2675.
65. Brunet Simioni M, De Thonel A, Hammann A, Joly AL, Bossis G, et al. (2009) Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity. *Oncogene* 28: 3332-3344.
66. Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB (2011) large potentials of small heat shock proteins. *Physiological Reviews* 91: 1123-1159.
67. Huang L, Min JN, Masters S, Mivechi NF, Moskophidis D (2007) Insights into function and regulation of small heat shock protein 25 (HSPB1) in a mouse model with targeted gene disruption. *Genesis* 45: 487-501.
68. Vidyasagar A, Wilson NA, Djamali A (2012) Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5: 7.
69. Arya R, Mallik M, Lakhota SC (2007) Heat shock genes - integrating cell survival and death. *Journal of Biosciences* 32: 595-610.
70. Fontaine JM, Sun XK, Benndorf R, Welsh MJ (2005) Interactions of HSP22 (HSPB8) with HSP20, alpha B-crystallin, and HSPB3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337: 1006-1011.
71. Andrieu C, Taieb D, Baylot V, Ettinger S, Soubeyran P, et al. (2010) Heat shock protein 27 confers resistance to androgen ablation and chemotherapy in prostate cancer cells through eIF4E. *Oncogene* 29: 1883-1896.
72. Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, et al. (2000) Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 19: 1975-1981.
73. Rocchi P, Beraldi E, Ettinger S, Fazli L, Vessella RL, et al. (2005) Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis. *Cancer Research* 65: 11083-11093.
74. Gibert B, Eckel B, Fasquelle L, Moulin M, Bouhallier F, et al. (2012) Knock down of heat shock protein 27 (HspB1) induces degradation of several putative client proteins. *PLoS One* 7: e29719.
75. DeBusk LM, Massion PP, Lin PC (2008) I kappa B Kinase-alpha Regulates Endothelial Cell Motility and Tumor Angiogenesis. *Cancer Research* 68: 10223-10228.
76. Gupta S, Gollapudi S (2005) Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in aging human T cell subsets. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 1034-1042.
77. Cuesta R, Laroia G, Schneider RJ (2000) Chaperone Hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes & Development* 14: 1460-1470.
78. Doerwald L, van Genesen ST, Onnekink C, Marin-Vinader L, de Lange F, et al. (2006) The effect of alpha B-crystallin and Hsp27 on the availability of translation initiation factors in heat-shocked cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 735-743.
79. Li S, Takasu T, Perlman DM, Peterson MS, Burrichter D, et al. (2003) Translation Factor eIF4E Rescues Cells from Myc-dependent Apoptosis by Inhibiting Cytochrome c Release. *Journal of Biological Chemistry* 278: 3015-3022.
80. Garrido C, Paul C, Seigneure R, Kampinga HH (2012) The small heat shock proteins family: The long forgotten chaperones. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44: 1588-1592.
81. Blunt BC, Creek AT, Henderson DC, Hofmann PA (2007) H2O2 activation of HSP25/27 protects desmin from calpain proteolysis in rat ventricular myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 293: H1518-H1525.
82. Melkani GC, Cammarato A, Bernstein SI (2006) [alpha]B-Crystallin Maintains Skeletal Muscle Myosin Enzymatic Activity and Prevents its Aggregation under Heat-shock Stress. *Journal of Molecular Biology* 358: 635-645.
83. Panagopoulou P, Davos CH, Milner DJ, Varela E, Cameron J, et al. (2008) Desmin mediates TNF-alpha-induced aggregate formation and intercalated disk reorganization in heart failure. *Journal of Cell Biology* 181: 761-775.
84. Bajaj G, Sharma RK (2006) TNF-alpha-mediated cardiomyocyte apoptosis involves caspase-12 and calpain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345: 1558-1564.
85. Moradas-Ferreira P, Costa V, Piper P, Mager W (1996) The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology* 19: 651-658.
86. Guillemin NP, Jurie C, Renand G, Hocquette JF, Micol D, et al. (2012) Different phenotypic and proteomic markers explain variability of beef tenderness across muscles. *International Journal of Biology* 4: 26-38.

Keywords:

Bioinformatics, Tenderness, Muscle, Interactome, Hsp27, HspB1-null mice

Competing Interests:

The authors have declared that no competing interests exist.



© 2013 Kammoun et al.

Licensee: Computational and Structural Biotechnology Journal.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are properly cited.

What is the advantage to you of publishing in *Computational and Structural Biotechnology Journal (CSBJ)* ?

- ✚ Easy 5 step online submission system & online manuscript tracking
- ✚ Fastest turnaround time with thorough peer review
- ✚ Inclusion in scholarly databases
- ✚ Low Article Processing Charges
- ✚ Author Copyright
- ✚ Open access, available to anyone in the world to download for free

WWW.CSBJ.ORG

Conclusion

Cette étude démontre les liens fonctionnels entre Hsp27 et certains de ses interacteurs dans des conditions basales (à thermo neutralité et sans stress appliqué). Les changements dans l'abondance de ces interacteurs dans les muscles de souris KO HspB1 pourraient être un mécanisme pour compenser l'absence de Hsp27. Nos données suggèrent que la voie apoptotique pourrait être stimulée chez les souris KO HspB1 grâce aux récepteurs, aux effecteurs, et aux inhibiteurs de l'apoptose. La Hsp27 semble moduler de nombreux éléments du cytosquelette et donc jouerait un rôle important dans sa stabilisation. Ceci explique pourquoi en l'absence de Hsp27 l'ultrastructure est modifiée. Tous ces éléments sont cruciaux pour le processus de la maturation de la viande. Sur la base de ces données, nous pouvons faire l'hypothèse que l'évolution *post-mortem* et le processus d'attendrissage de la viande bovine pourrait dépendre non seulement de la protéolyse mais également de la régulation des processus apoptotiques, et la protection contre le stress oxydatif. Ceci est en accord avec la nouvelle vision de la mise en place de la tendreté proposée par Ouali *et al.* (2006).

Article IV : Kammoun et al.
En préparation pour une soumission
à «Journal of proteomics»

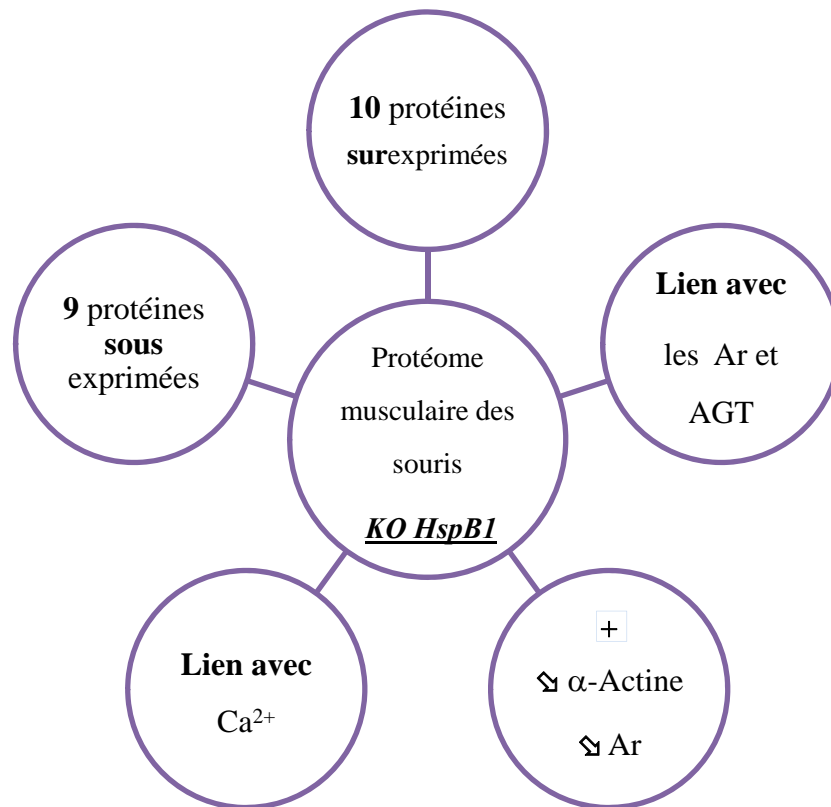
Article IV: A proteomic based approach for revealing HspB1 knock-out targets in muscle.

Kammoun M., Cassar-Malek I., Barboiron C., Meunier B., Chambon C., Picard B

Introduction

En complément à l'approche ciblée sur les interacteurs directs connus de HspB1 dans la publication précédente, il s'agissait ici de compléter le phénotypage moléculaire par une étude *sans a priori*.

L'approche protéomique permet d'analyser le protéome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines présentes dans un tissu et de comparer à celui d'un autre tissu présentant un phénotype différent. Cette approche s'appuie sur l'électrophorèse bidimensionnelle, l'analyse des gels et l'identification des protéines par spectroscopie de masse. Dans ce travail, l'utilisation de la protéomique a été utile pour établir une liste de protéines différentiellement abondantes entre les deux contextes génétiques c'est-à-dire en absence et en présence de la Hsp27 (Figure 21). Ces protéines ont ensuite fait l'objet d'une validation par Western-blotting. Les outils bio-informatiques m'ont permis d'explorer les relations fonctionnelles entre ces protéines et Hsp27. Cette publication est en cours de rédaction pour une soumission dans la revue *Journal of Proteomics*. Elle sera complétée par des résultats en cours d'acquisition.



- L'analyse protéomique a permis de déterminer une nouvelle liste de protéine cible en interaction avec la protéine Hsp27.
- L'intégration de ces protéines dans un réseau d'interaction a permis de distinguer AR, AGT et Ca^{2+} dans des nœuds de croisement en lien avec :
 - ❖ Le développement
 - ❖ L'apoptose
 - ❖ Le maintien du cytosquelette musculaire
- Interaction directe de la Hsp27 avec α -Actine. En accord avec les résultats obtenus en ultrastructure.

Figure 21. Analyse du protéome musculaire des souris KO HspB1

Ca^{2+} : Calcium

AR : Récepteurs aux androgènes

AGT : Angiotensinogène (Serpine A 8)

⌘ Diminution de l'abondance

Résumé

Dans cette étude, la comparaison des profils protéiques a révélé 19 protéines différentiellement exprimées entre les deux groupes d'animaux (KO HspB1 vs témoins). Dix protéines présentent une augmentation d'abondance chez les KO HspB1 (Figure 21). L'inactivation du gène HspB1 a été associée à des modifications de l'abondance de certaines Hspsprotéines de choc thermique (HspA8, HspA9), de PARK7, de protéines contractiles (MyH4) et sarcoplasmiques (Srl et Casq1), et des protéines du métabolisme (Aldh2, Pygm). Un rôle très important du calcium et des récepteurs aux androgènes (Ar) a été suspecté suite à l'intégration de l'ensemble des données protéomiques par une analyse bio-informatique. Les résultats de Western-blotting montrent une diminution de l'abondance musculaire des Ar chez les souris KO HspB1.

A proteomic based approach for revealing HspB1 knock-out targets in muscle

Kammoun M.¹, Cassar-Malek I.¹, Barboiron C.¹, Meunier B.¹, Chambon C.², Picard B.^{1*}

¹INRA-Vetagro Sup, UMR1213, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

²INRA-PFEM, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

*Corresponding author. Phone: + 33 4 73 62 40 56. Fax: +33 4 73 62 46 39, E-mail address:

brigitte.picard@clermont.inra.fr

Keywords: 2D-electrophoresis, MS-MS, skeletal muscle, HspB1-null mouse

11 Abstract

12 Hsp27, a member of small heat shock family, has been identified as a beef tenderness
13 biomarker. It was founded at a crucial hub in a functional network involved in beef
14 tenderness. In this study, we performed a proteomic analysis to detect changes in the
15 abundance of proteins consequently to the invalidation of HspB1 gene (encoding Hsp27
16 protein) in mouse. Comparison of the protein profiles revealed 10 up- and 9 down- regulated
17 proteins. The main results showed that knockout of HspB1 gene was associated with changes
18 in the abundance of some heat shock proteins HspA8, and HspA9, of Park7 and of proteins
19 involved in calcium homeostasis such as Sarcalumenin (Srl). In addition a network analysis of
20 proteomic data revealed that that the androgen receptor (Ar) was connected to HspB1 through
21 several target proteins. Western-blotting demonstrated lower abundance of Ar in HspB1-null
22 mice. All together our results indicate that changes in the Hsp status, regulation of
23 intracellular calcium and probably androgen signaling pathway probably account for the
24 response of the m. *Tibialis anterior* to the absence of Hsp27.

25

1. Introduction

Beef tenderness has been the subject of much research over the past years. Genomic studies have enabled to highlight a number of protein biomarkers of this quality [1]. These biomarkers were analysed using bioinformatics in order to establish a functional network involved in beef tenderness [2]. This network was constituted of 330 proteins implicated in different biological functions such as muscle structure, metabolism, contraction, oxidative stress and apoptosis. In this analyze the GO functions “apoptosis” and “regulation of apoptosis” represented 16 % of the overall occurrences of the interactome GO functions demonstrating the importance of apoptosis (cell death program) in tenderness. This is in accordance with the theory of Ouali et al. [3] suggesting that apoptosis would enhance the tenderness by initiating cellular proteolysis during the early stage of tenderization, just after slaughtering. This mechanism is associated with the destruction of cytoskeleton under the action of proteases such as caspases.

Among this network of tenderness, heat shock proteins (Hsps) were highly represented. Especially the Hsp27 protein, encoded by the HspB1 gene, was a hub protein suggesting its key role in tenderness. In order to understand the cellular mechanisms involved in tenderness through Hsp27 protein and its interactors, we generated a model of knock-out mice with targeted invalidation of the HspB1 gene [4]. In a first study we have used a network-basis approach combined to biochemistry to reveal the Hsp27 interactors that may be related to tenderness. However the approach predicted Hsp27 targets solely in the m. *Soleus* [5].

In the present study, we aimed at looking for interactors of Hsp27 without *a priori* in the m. *Tibialis*. We used proteomics (two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry) to analyze the consequences of the targeted invalidation of the HspB1 gene on the protein profile in this muscle. Then, we validated the differential results by western-blotting. A bioinformatic analysis was performed to identify pathways involved in the functions of Hsp27 which could be important for beef tenderness.

2. Material and methods

2.1. Animals and experimental procedure

Constitutive knock-out mice with a gene deletion of HspB1 (HspB1-null mice) were obtained through targeted insertion (homologous recombination) [4]. About 100 % of the HspB1 coding sequence gene was replaced by bacterial vector obtained from BMQ BAC library (Mouse Micer vector set 369N20). Mice were housed at the experimental plant of nutrition and microbiology of the National Institute of Agronomic Research (INRA-France), in a temperature and humidity controlled room under a 12 hours light and dark cycle. They were fed *ad libitum*. Experimental procedures and animal holding respected French animal protection legislation including licensing of experimenters. They were controlled and approved by the French Veterinary Services (agreement number CE 84-12).

2.2. Muscle samples

The HspB1-null mice and their control littermates were sacrificed at 12 weeks postnatal. Samples of the *Tibialis Anterior* muscle (fast glycolytic) were taken immediately after sacrifice, frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until protein extraction. Total protein extractions were performed on five mice from each genotype according to Bouley et al. [6] in a denaturation/extraction buffer (8.3 M urea, 2 M thiourea, 1% DTT, 2% CHAPS) and stored at -20°C until use. The protein concentration was determined by spectrophotometry with the Bradford assay [7].

2.3. Proteomic analysis

Two-dimensional gel electrophoresis

Isoelectrofocalisations (IEF) were realised in PROTEAN IEF-cell (Bio-rad, Hercules, USA) with 18 cm long IPG strips pH range 5-8. The method used was previously described by Bouley *et al* [6] with the exception that after a desalting step (50V, 7h) proteins were separated according to the following conditions: 200V for 1h, 500V for 1h, 1000V for 3h, increasing to 8000V over 9h, 8000V continuously until 73500Vh.

SDS-PAGE (T=11%, C=2.6%) was run on a PROTEAN plus Dodeca cell system (Bio-Rad, Hercules, USA) at 40V for 1h and 15mA per gel and 110V until the Bromophenol blue migration front reached the bottom of all gels.

Two-DE gels were stained with G250 Colloidal Coomassie Blue for 72h as described previously [6]. After staining, gels were rinsed overnight in fresh distilled water before digitization

Two-DE gel images were acquired using an Expression 10000XL Pro Scanner (Epson, Japan) at 300 dots per inch (dpi). Image warping, spot detection and volume quantification were carried out using the SameSpots v3 software (Nonlinear Dynamics, UK).

Protein identification by Mass Spectrometry LC-MS/MS

Coomassie-stained spots of interest were excised by hand from at least three different replicate gels and subjected to the following treatments. First, the spots were washed in 25 mM ammonium bicarbonate – 5% acetonitrile for 30 min and twice in 25 mM ammonium bicarbonate – 50% acetonitrile for 30 min each. The spots were then dehydrated with 100% acetonitrile. The dried gels were reswelled in 25 mM ammonium bicarbonate and digested at 37°C for 5 h with 10 to 15µl (depending on gel volume to be treated) of trypsin solution (12 ng/µL; V5111, Promega, Madison, WI). After peptide extraction with 8 to 12 µl of acetonitrile and concentration, peptide mixtures were analyzed by online nanoflow liquid chromatography using the Ultimate 3000 RSLC (Dionex, Voisins le Bretonneux, France) with nanocapillary columns of 15 cm length × 75 µm i.d (Acclaim Pep Map RSLC, Dionex). The solvent gradient increased linearly from 4 to 50% ACN in 0.5% formic acid at a flow rate of 300 nL/min for 30 min. The elute was then electrosprayed in a LTQ-VELOS mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) through a nanoelectrospray ion source which was operated in a CID top 10 mode (i.e., 1 full scan MS and the 10 major peaks in the full scan were selected for MS/MS). Thermo Proteome Discoverer v1.2 was used for raw data file processing and Mascot (V2.2, www.matrixscience.com) for protein identification. For the searches in mouse database (<http://www.uniprot.org>, 50287 seq), the following parameters were considered for the searches: peptide mass tolerance was set to 1.5 Da, fragment mass tolerance was set to 0.8 Da and maximum of two missed cleavages were allowed. Variable modifications were methionine oxidation (M) and carbamidomethylation (C) of cysteine. A protein was considered valid when a minimum of three unique peptides originating from one protein showed statistically significant (individual peptide score > 39; $p < 0.05$).

Protein spots with more than one protein identified in the mixture were considered for biological interpretation only if they passed both of the following criteria: (i) the relative abundance based on the number of sequenced peptides per protein (EmPAI protein content

(mol%) (http://www.matrixscience.com/help/quant_empai_help.html) for the most abundant protein was larger than 50%, and moreover (ii) the ratio of the EmPAI for this most abundant protein to emPAI for the second most abundant protein in the spot mixture was at least 2).

In complement a bioinformatic analysis was realised with Pathway Studio, in order to help us for the choice proteins in relation with HspB1.

2.4. Western-blotting validation

Variation in protein abundance between the two genotypes was validated using a quantitative western-blotting technique. It was processed exactly as described in Chaze et al. [8]. Fifteen or 30 µg of proteins were separated by gel electrophoresis using SDS-PAGE for 2 h according to the Laemmli's method [9]. After migration, the proteins were transferred onto PVDF transfer membrane Millipore (Bedford, MA01730 U S A). Membranes were then blocked with 5% non-fat milk in TBS1 x buffer containing (blocking solution) and incubated under gentle agitation all the night at room temperature in the presence of the primary antibodies. Then the membranes were incubated at 37°C for 30 minutes with the secondary fluorochrome-conjugated LICOR-antibody. Infrared fluorescence detection was then used for protein quantification. Membranes were scanned by the scanner Odyssey (LI-COR Biosciences) at 800 nm. Band volumes were quantified in the images using ImageQuant TL v2003 software (Amersham). Protein abundance for each sample is given in arbitrary units. The specificity and conditions of use of primary antibodies against candidate proteins were first defined. An antibody was considered specific when its target bands were detected at the expected molecular weight. The specific dilutions used for each antibody are reported in Table 1. Secondary fluorescent-conjugated IRDye 800CW antibodies were supplied by LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA) and used at 1/20000.

Western-blotting images were analysed under ImageQuant TL v2003 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

2.5. Bioinformatic analyses

The interaction information about the unknown interactors of Hsp27 were provided by the software for systems biology Pathway Studio (Ariadne Genomics) using information stored and shared in bioinformatic databases. Pathway Studio helps to interpret experimental data in the context of pathways, gene regulation networks, protein interaction maps, and to automatically update pathways with newly published facts using MedScan technology

(www.elsevier.com). The Medscan reader extracts the relationship information from literature. We used the ResNet Mammalian (human, rat and mouse) database which contained the latest information extracted from the literature and from published high-throughput experiments. The filter options used were “protein” as entity type and “direct regulation” and “indirect regulation” as applicable relation types. The ontology was done with *Panther classification system* for *Mus musculus* (<http://www.pantherdb.org/>).

2.6. Statistical analysis

One-way ANOVA was processed under SameSpots to highlight spots differentially expressed between groups with $p < 0.05$. The differences in muscle protein abundance between HspB1-null mice ($n=5$) and their controls ($n=5$) were assessed by the Student t-test using XLSTAT Software [10]. Results are expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM). A difference between groups was considered significant when $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Changes in protein profiles

The first step of our study was to identify Hsp27 targets or novel partners through examination of protein profiles in the HspB1-null mice. About 464 protein spots were detected in the reference gel from pI 5.5 to pI 7.8 and over the total mass ranges from 15 to 150 kDa. As shown in Table 1 the statistical analyses of comparative proteomic analysis revealed 24 spots differentially expressed between HspB1-null mice and their controls. Nineteen proteins of interest including Hsp27 were identified by mass spectrometry with significant differences. Ten proteins were more abundant in the *Tibialis anterior* muscle of the HspB1-null mice and 9 were less abundant (Figure 1).

A gene ontology analysis of these 19 proteins (Figure 2) indicated that 60% were intracellular proteins and 40% were plasmic membrane proteins. Of these proteins, 42.9 had a catalytic activity as a molecular function. The biological processes most represented in this list are the metabolic process (27%), cellular process (11%) system process (11%), cell communication (9%) and cell transport (9%).

In the second step, we selected a list of proteins for validation according to the statistical signification of the differences in spot abundance between HspB1-null mice and their controls (Table 2) and to information from protein interactome (Figure 3). The Figure 3 presents the

network connecting these 19 proteins. Ten target proteins were retained for Western-blotting analysis: highly connected proteins (nodes) in this network (namely HspA8, HspA9, HspB1, Aldh2, Park7, Myh4, Alb, Mdh1), Srl (5 spots), Casq1 and Pygm. Table 3 illustrated the results of Western-blotting which allowed validating the lower abundance of HspA9, HspA8 and Park7 in HspB1-null mice as expected according to Table 2. The differential abundance of four proteins could not be validated.

3.2. Protein interactomes

A second bioinformatic analysis was realized based on these protein targets in order to understand their biological relationships to HspB1 (Figure 4). A large network connecting all these proteins except Sarcalumenin (Srl) and Glycogen phosphorylase (Pygm) was obtained (Figure 4). In this network, most of the proteins were indirectly connected to HspB1.

Three proteins namely HspA9, HspA8, Park7 were related to HspB1 through the androgen receptor (Ar) (Figures 4 and 5). HspA8 and HspB1 were connected through 14 proteins mainly involved in muscle structure, apoptosis, cell growth, and Ca²⁺ binding. Proteins connecting HspB1 to Park7 are mainly involved in muscle structure and apoptosis, another group belongs to apoptosis and oxidative stress. A common group of proteins relating Park7, HspA9, and HspB1 is involved in cell growth, apoptosis and oxidative stress (Figure 5). Five proteins belonging to cell growth and protein metabolism linked HspA8 to HspA9. Finally 5 others proteins corresponding to growth, metabolism and apoptosis were in interaction with HspA9, HspB1, and Aldh2.

Sarcalumenin which had no direct interactions with HspB1 was connected to Casq1 through calcium (Figure 6). This is in accordance with other studies demonstrating indirect relationship between Srl and Casq1 through Ca²⁺. Figure 6 suggests that this relation concerns more the fast muscle fibers as illustrated by the direct interactions of Srl with Atp2A1 (fast) and Atp2A2 (slow), two sarcoplasmic ATPases involved in the calcium transporting.

3.3. Identification of the androgen receptor as target of HspB1 invalidation

The sub-network on Figure 5 showed that Androgen receptor (Ar) is at cross-road between HspB1 and several differential proteins. This suggested that Ar could be a target of HspB1 knock-out. So we examined the abundance of the Ar by Western-blotting analysis and found its lower abundance in HspB1 null mice vs controls (P<0.01) (Figure 7). These data are in accordance with the proposed role of Hsp27 as a chaperone interacting with the Ar. Zoubeidi

et al. [11] reported that Hsp27 *in vitro* knock-down induced Ar degradation *via* the proteasome-mediated pathway. In their study, Hsp27 knock-down inhibits androgen-stimulated nuclear translocation of the Ar with subsequent suppression of the Ar regulated gene expression. A recent report also indicates that Hsp27 is a mediator of repression of Ar function [12]. In cattle, Guillemain *et al.* [13] showed lower abundance of HspA8, HspA9, and Park7, and a higher abundance of HspB1 in steers (castrated animals) comparatively to young bulls (non castrated animals). Altogether these data suggest that Hsp27/Ar interactions could contribute to modulate of the abundance of these proteins as indicated in the present study.

3.4. Identification of proteins involved in calcium homeostasis as putative targets of HspB1 invalidation

The proteomic analysis allowed us to detect two proteins involved in calcium homeostasis as differentially abundant in HspB1-null mice (Table 2) namely Srl and Casq1. In skeletal muscle cells fine regulation of Ca^{2+} storage, uptake and release is achieved through the concerted action of three major classes of Sarcoplasmic reticulum (SR) calcium-regulatory proteins: calsequestrin, juncate and sarcalumenin for calcium storage; SR calcium release channels such as Ryanodine receptor (Ryr) for calcium release and SR Ca^{2+} -ATPase (Serca) pumps for calcium reuptake. Five spots of Srl were detected by our comparative proteomics between HspB1 null mice and their controls suggesting the importance of this protein in our model (Figure 1 and Table 2). These spots belonged to a spot train and were likely different phosphorylated forms of the protein. The differential abundance of a 53 kDa Srl-immunoreactive band could be validated by Western-blotting. Srl has been characterized as a low-affinity, high-capacity Ca^{2+} binding protein within the longitudinal sarcoplasmic reticulum (SR) [14], it locates in both the longitudinal tubules and the terminal cisternae region of the SR. It colocalizes with SR endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (Serca). The expression of Srl is similar in slow and fast-twitch muscle fibres. Srl is considered as a key luminal Ca^{2+} -binding protein. It functions as an intraluminal ion transporter and has a physiological role as buffering Ca^{2+} -element. It maintains muscle Ca^{2+} homeostasis and is involved in the sequestration of Ca^{2+} in the nonjunctional region of the SR [14].

Calsequestrin (Casq1) is an important regulatory of Ca^{2+} . It is located in the supramolecular membrane assembly in the terminal cisternae region of muscle fibres. It represents a high-capacity, medium-affinity -binding protein restricted to junctional Sr. Casq1 plays a key role in both homeostasis and terminal cisternae structure and acts as physiological mediator of the

excitation-contraction relaxation cycle through regulation of the ryanodine receptor complex (Ryr) [15]. Casq1 isoform is expressed in both fast and slow twitch muscles at increasing levels from birth to adulthood. Interestingly, Casq1 knock-out does not alter contractile responses of muscle fibres but induces profound ultrastructure remodeling, reduced content of stored Ca^{2+} and reduced amplitude of Ca^{2+} transient [16]. This demonstrates the crucial role of the protein for the fine muscle architecture.

In skeletal muscle, the sarcoplasmic reticulum (SR) is responsible for the control of cytosolic Ca^{2+} concentrations. Excitation of muscle cells induces release of Ca^{2+} from lumina spaces of SR and during muscle relaxation Ca^{2+} is reuptaken from the cytosol into the lumen of the SR through the action of ATPase. Ca^{2+} has also a role in signal transduction. Increased cytosolic Ca^{2+} levels contribute to enhanced protease activity. Pathological reduction of Ca^{2+} -binding capacity of the SR induced increase of the free cytosolic Ca^{2+} levels accelerating the Ca^{2+} -dependant proteolysis of muscle proteins. The study of Dowling *et al.* [17] demonstrated that is partially caused by a reduction in Srl because of an altered oligomerization status of Casq1.

3.5. Mechanisms associated with HsbB1 knock-out and implications for meat quality

Proteins involved in Ca^{2+} regulation are important for meat quality. It is well documented that aberrant calcium regulation in early *post-mortem* period is associated with inferior meat quality [20]. Birds with PSE (Pale Soft Exudative) meat failed to respond to heat stress because of a delay in the up-regulation of calcium-regulating genes Ryr and Casq1. In meat, it is well documented that skeletal muscle alterations induced by modification of Ca^{2+} flux in SR during ageing, result in protein proteolysis involving ultra-structural modifications. Alpha-actin is one of the myofibrillar proteins the most concerned by this proteolysis. As Hsp27 is known to protect α -actin, lower α -actin abundance in the muscle of HspB1-null mice could be expected. This was confirmed by Western-blotting analysis in the present study (Table 3).

Lastly, the network between HspA9, HspA8, HspB1, and Ar comprised two key proteins at cross nodes, namely Bax (an apoptosis promoter) and Agt (Serpine A8, a serpin inhibitor) (Figure 5). Several studies have shown that Agt and Bax are involved in meat tenderness [18]. A higher abundance of Bax and Agt is correlated positively with meat tenderness. In the HspB1-null mice the level of Bax could be increased due to the absence of the negative effect of HspA9 and HspB1 but the predicted difference for Bax was not validated by the Western-blotting analysis. In the other hand the lower abundance of HspA8 could affect decrease the inhibition of Agt in the HspB1-null mice. Lastly the network also predicted that HspA8 exerts

an inhibitory effect on Caspase 3 (Casp3) a calcium-dependent protein of the apoptotic pathway that is implicated in meat tenderness [19].

4. Conclusion

In conclusion, proteomics allowed us to reveal proteins in relation with HspB1 in the *Tibialis anterior* muscle. The present data are complementary to those obtained in a previous analysis focused on the direct interactors of HspB1 [5] in which we reported muscle-specific differences in the HspB1-null mice. Very few differences were found in the *Tibialis anterior* muscle comparatively to the *Soleus* muscle. In the present study, the proteins in interaction with HspB1 belong mainly to Hsps family, apoptosis pathway, and calcium homeostasis. All these functions are important for the conversion of muscle into meat. These data allow us to hypothesize a crucial role for HspB1 knock-out targets in meat tenderness. The associated pathways could account for the determinism of tenderness in glycolytic muscle. This will be further investigated in bovine muscles.

5. Acknowledgements

The authors thank G. Gentes and N. Dunoyer for excellent technical assistance.

287

Table 1: Suppliers and conditions for each antibody used in this study

Protein	Protein name	Primary antibody type	References	Dilution
Pygm	Glycogen phosphorylase	Polyclonal	Santa Cruz : SC-46347	1/1000
Casq1	Calsequestrin-1	Monoclonal	Santa Cruz : SC-137080	1/1000
Srl	Sarcalumenin	Monoclonal	Santa Cruz : SC-58845	1/1000
Aldh2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	Polyclonal	Santa Cruz : SC-78837	1/1000
Park7	Parkinson disease protein 7 homolog	Polyclonal	Santa Cruz : SC-32874	1/250
HspA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	Monoclonal	Santa Cruz : SC-59572	1/250
HspA9	Stress-70 protein, mitochondrial	Monoclonal	R&D Systems : MAB3584	1/200
Mdh1	Malate dehydrogenase	Monoclonal	Rockland 100-601-145	1/1000
Alb	Albumin	Polyclonal	Polysciences : 23715-5	1/100
Bax	Apoptosis regulator BAX	Monoclonal	Santa Cruz : SC-7480	1/1000
AR	Androgen receptor	Polyclonal	Santa Cruz : SC-31358	1/1000
Acta1	α -Actine	Monoclonal	Santa Cruz : SC-58670	1/1000

288

Table 2. List of proteins differentially abundant in the m. *Tibialis anterior* between HspB1-null mice and their control littermates *En préparation*

Spot_ID	Protein ID	Protein	Protein name	score	Σ Coverage	Mr [kDa]	calc. pI	Anova (p)	Fold	Effect
2404	Q5SX39	Myh4	Myosin-4	4544.17	19.44	222.7	5.74	0.0064	1.22	WT>KO
1414	A2A6I8	Tnnt3	Troponin T	4530.73	44.35	28.3	9.36	0.0313	1.14	KO>WT
1781	Q99LX0	Park7	Protein DJ-1	1693.43	83.07	20.0	6.77	0.0140	1.13	WT>KO
2338	P07724	Alb	Serum albumin	7254.76	72.53	68.6	6.07	0.0132	1.25	KO> WT
902	O09165	Casq1	Calsequestrin-1	1176.41	26.17	46.3	4.12	0.0360	1.38	KO>WT
1273	P07310	Ckm	Creatine kinase M	4104.48	53.02	43.0	7.06	0.0594	1.42	WT>KO
2422	P14152	Mdh1	Malate dehydrogenase	2973.62	48.50	36.5	6.58	0.0059	1.16	KO>WT
462	Q9WUB3	Pygm	Glycogen phosphorylase	5946.10	55.70	97.2	7.11	0.0045	1.97	KO>WT
1082	P47738	Aldh2	Aldehyde dehydrogenase	984.38	57.61	56.5	7.62	0.0138	1.21	KO>WT
2361	Q7TQ48	Srl	Isoform 2 of Sarcalumenin	4731.14	60.17	54.3	6.64	0.0013	1.16	KO>WT
1070	Q7TQ48	Srl	Isoform 2 of Sarcalumenin	4730.75	65.47	54.3	6.64	0.0149	1.43	KO>WT
1071	Q7TQ48	Srl	Isoform 2 of Sarcalumenin	1260.25	60.17	54.3	6.64	0.0197	1.31	KO>WT
1074	Q7TQ48	Srl	Isoform 2 of Sarcalumenin	1576.43	60.17	54.3	6.64	0.0336	1.34	KO>WT
1075	Q7TQ48	Srl	Isoform 2 of Sarcalumenin	4266.69	60.17	54.3	6.64	0.0881	1.23	KO>WT
1752	P17751	Tpi1	Triosephosphate isomerase	760.45	51.51	32.2	5.74	0.0599	1.46	WT>KO
1786	Q9R0Y5	Ak1	Adenylate kinase isoenzyme 1	2595.48	63.40	21.5	5.81	0.0045	1.24	WT>KO
2362	P38647	HspA9	Stress-70 protein, mitochondrial	1005.69	35.79	73.4	6.07	0.0064	1.22	WT>KO
2404	P63017	HspA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	430.98	27.09	70.8	5.52	0.0860	1.15	WT>KO
1844	Q9D7X3	Dusp3	Dual specificity protein phosphatase 3	1199.97	59.46	20.5	6.54	0.0588	1.18	WT>KO
1511	Q9DB05	Napa	Alpha-soluble NSF attachment protein	2396.08	81.02	33.2	5.45	0.0372	1.16	KO>WT
1723	P14602	HspB1	Isoform B of Heat shock protein beta-1	1384.66	67.01	21.9	6.95	0.0005	1.47	WT>KO
1382	Q9DCZ1	Gmpr	Guanosine 5'-monophosphate oxidoreductase 1	1127.11	59.71	37.5	7.09	0.0272	1.24	KO>WT
2374	Q9D051	Pdhb	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	4353.89	55.71	38.9	6.87	0.0057	1.08	KO>WT

Spot ID: Identifiant of spot in 2D gel.

Protein ID: Identifiant from SWISSPROT: protein sequence database: <http://www.uniprot.org/>

Mr: Molecular weight, kDa: Kilodalton, calc.:Calc. pI: Calculated isoelectric point

Anova: Analysis of variance

KO: HspB1-null mice, WT: Controls mice

Table 3. Abundance of selected proteins in the m. *Tibialis anterior* of HspB1-null mice vs control mice

	KO HspB1 ⁻	WT	SEM	Signification
Pygm	61072	64897	4897	NS
Casq1	107586	103184	5015	NS
Aldh2	112931	105648	11716	NS
HspA9	20946	40914	3583	**
HspA8	233744	404037	32292	**
Park7	328440	383780	17540	*
Mdh1	93353	161232	23589	t
Srl	18690	17144	489	t
Alb	955617	975046	20705	NS
Bax	29834	33376	2465	NS
Ar	611888	1001119	75910	**
Acta1	134864	159617	5214	*

The abundances of 13 proteins were measured by Western-blotting.

The protein names are presented in Table 1. Protein abundance for each sample is given in arbitrary units.

The absence of Hsp27 was checked HspB1null-mice (KO) vs controls (WT) in a previous study (Kammoun et al., 2013).

t: tendency, P<0. 1; *: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001;

Acta1 : α -Actin

Ar : Androgen receptor

Bax : bcl-2-like protein 4

HspB1-null mice (n=5); control mice (n=5)

References

- [1] Picard B. Relationship between muscle fibers, growth efficiency and beef quality. In proceedings of the 8th SIMCORTE. Viçosa, Minas Gerais (Brasil)2012.
- [2] Guillemain N, Bonnet M, Jurie C, Picard B. Functional analysis of beef tenderness. J Proteomics. 2011;75:352-65.
- [3] Ouali A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L, et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. Meat Sci. 2006;74:44-58.
- [4] Kammoun M, Picard B, Astruc T, Blanquet V, Cassar-Malek I. The invalidation of HspB1 gene does not impair mouse development but alters the ultrastructural phenotype of muscles. PLoS ONE. 2013;submitted.
- [5] Kammoun M, Picard B, Henry-Berger J, Cassar-Malek I. A network-based approach for predicting Hsp27 knock-out targets computational and Structural Biotechnology Journal 2013;accepted.
- [6] Bouley J, Chambon C, Picard B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Proteomics. 2004;4:1811-24.
- [7] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.
- [8] Chaze T, Meunier B, Chambon C, Jurie C, Picard B. In vivo proteome dynamics during early bovine myogenesis. PROTEOMICS. 2008;8:4236-48.
- [9] Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-5.
- [10] Microsoft o. XLSTAT Software In: Data analysis and statistics with MS Excel A, editor.2013.
- [11] Zoubeydi A, Zardan A, Beraldi E, Fazli L, Sowery R, Rennie P, et al. Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity. Cancer Research. 2007;67:10455-65.
- [12] Hassan S, Biswas MH, Zhang C, Du C, Balaji KC. Heat shock protein 27 mediates repression of androgen receptor function by protein kinase D1 in prostate cancer cells. Oncogene. 2009;28:4386-96.
- [13] Guillemain N, Jurie C, Cassar-Malek I, Hocquette J, Renand G, Picard B. Variations in the abundance of 24 proteins biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. Animal. 2011;6:867 - 74.
- [14] Leberer E, Timms BG, Campbell KP, MacLennan DH. Purification, calcium-binding properties, and ultrastructural-localization of the 53,000-dalton and 160,000 (sarcoplumenin)-dalton glycoproteins of the sarcoplasmic-reticulum. J Biol Chem. 1990;265:10118-24.
- [15] Ohkura M, Furukawa KI, Fujimori H, Kuruma A, Kawano S, Hiraoka M, et al. Dual regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor by triadin and calsequestrin. Biochemistry. 1998;37:12987-93.
- [16] Tomasi M, Canato M, Paolini C, Dainese M, Reggiani C, Volpe P, et al. Calsequestrin (CASQ1) rescues function and structure of calcium release units in skeletal muscles of CASQ1-null mice. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2012;302:C575-C86.

- [17] Dowling P, Doran P, Ohlendieck K. Drastic reduction of sarcalumenin in Dp427 (dystrophin of 427 kDa)-deficient fibres indicates that abnormal calcium handling plays a key role in muscular dystrophy. *Biochemical Journal*. 2004;379:479-88.
- [18] Ouali A, Gagaoua M, Boudida Y, Becila S, Abdelghani B, Sentendreu MA. Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms *Meat Sci*. 2013;Submitted
- [19] Ouali A, Herrera-Mendez C, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L, et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci*. 2006;74:44 - 58.
- [20] Sporer KRB, Zhou HR, Linz JE, Booren AM, Strasburg GM. Differential expression of calcium-regulating genes in heat-stressed turkey breast muscle is associated with meat quality. *Poultry Science*. 2012;91:1418-24.

Figure captions

Figure 1. Representative 2-D map of proteins extracted from *Tibialis anterior* muscle. 2-DE was performed using a 5-8 pH gradient in the first dimension and SDS-Page (T=11%, C=2.6%) in the second. 700 µg of protein were loaded. Two-DE gels were stained with G250 Colloidal Coomassie Blue.

Proteins more abundant in HspB1-null mice are presented in red and those less abundant are presented in green.

The protein names are presented in Table 2.

M_r: Molecular weight ;*kDa*: kilodalton

Figure 2. The Gene Ontology of the 19 proteins identified by mass spectrometry.

Panther classification system for Mus musculus (<http://www.pantherdb.org/>).

Figure 3. Interactome of the 19 proteins identified by mass spectrometry.

The network was built using Pathway Studio with mammals databases. The filter options were: *protein* as an applicable entity type, *regulation* and *direct regulation* as applicable relation types.

Proteins selected for Western-blotting analyses are represented in green bubbles.

The protein names are presented in Table 1.

Figure 4. Interactome of the 11 proteins selected for Western-blotting analyses.

The network was built using Pathway Studio. The filter options were: *protein* as an applicable entity type, *regulation* and *direct regulation* as applicable relation types.

Proteins selected for Western-blotting analyses are highlighted in yellow.

The protein names are presented in Table 2.

Figure 5. Sub-Network identifying the Androgen receptor as a putative target

The network was built using Pathway Studio.

Proteins selected for Western-blotting analyses are highlighted in blue.

The protein names are presented in Table 2.

Figure 6. Sub-Network connecting Sarcalumenin and Calsequestrin with calcium

The network was built using Pathway Studio.

390 **Figure 7.** Abundance of the Androgen receptors in the m. *Tibialis anterior* of
391 Western-blotting was done with 30µg of total protein extraction from mouse *Tibialis anterior*
392 muscle per well. Specificity of the antibody was checked by detection of a single band
393 corresponding to the theoretical molecular Wight of Ar from mouse (110 kDa).
394 *kDa*: Kilodalton; *KO*: *HspB1*-null mice; *WT*: Controls

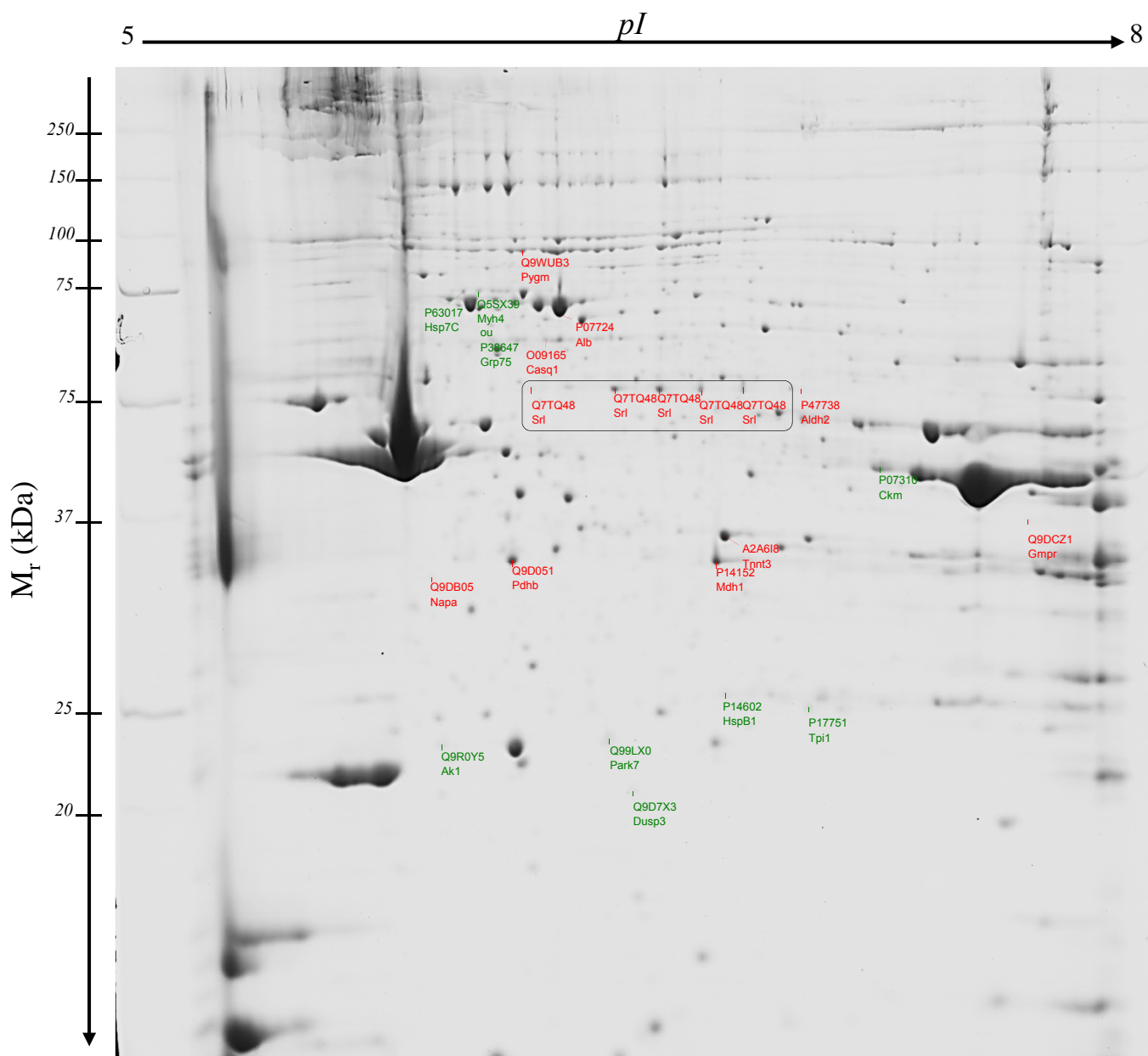
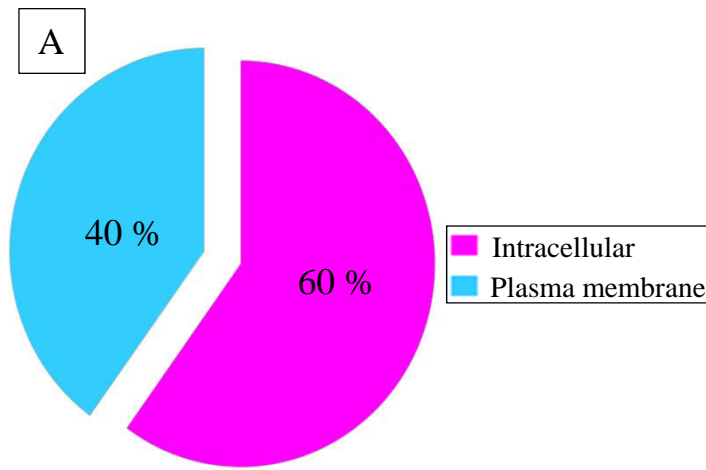
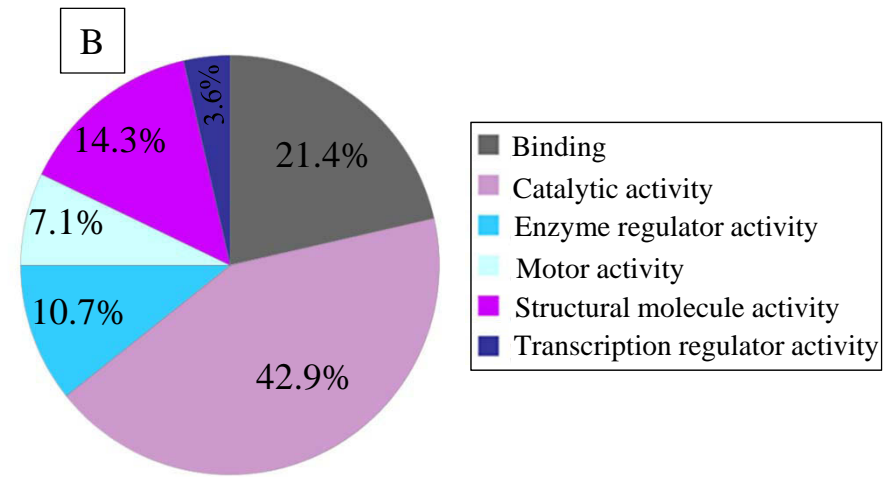


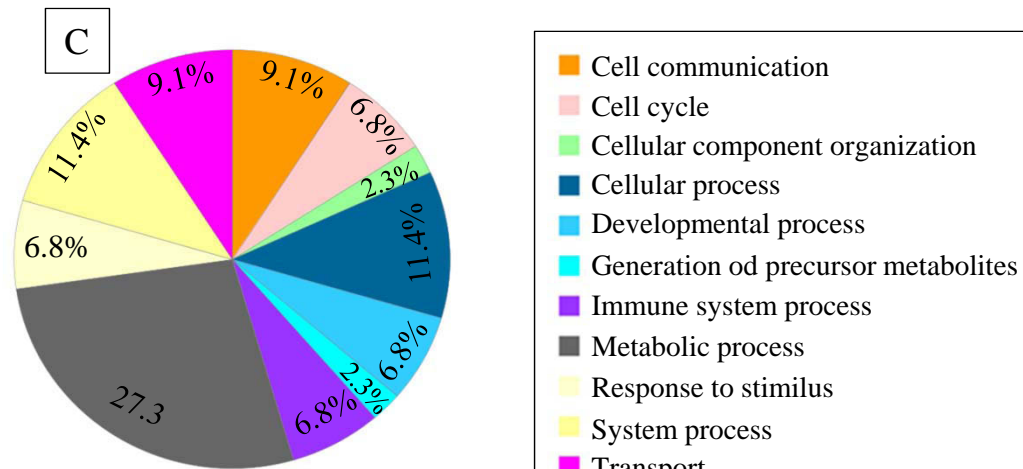
Figure 1.



Localisation



Molecular function



Biological process

Figure 2.

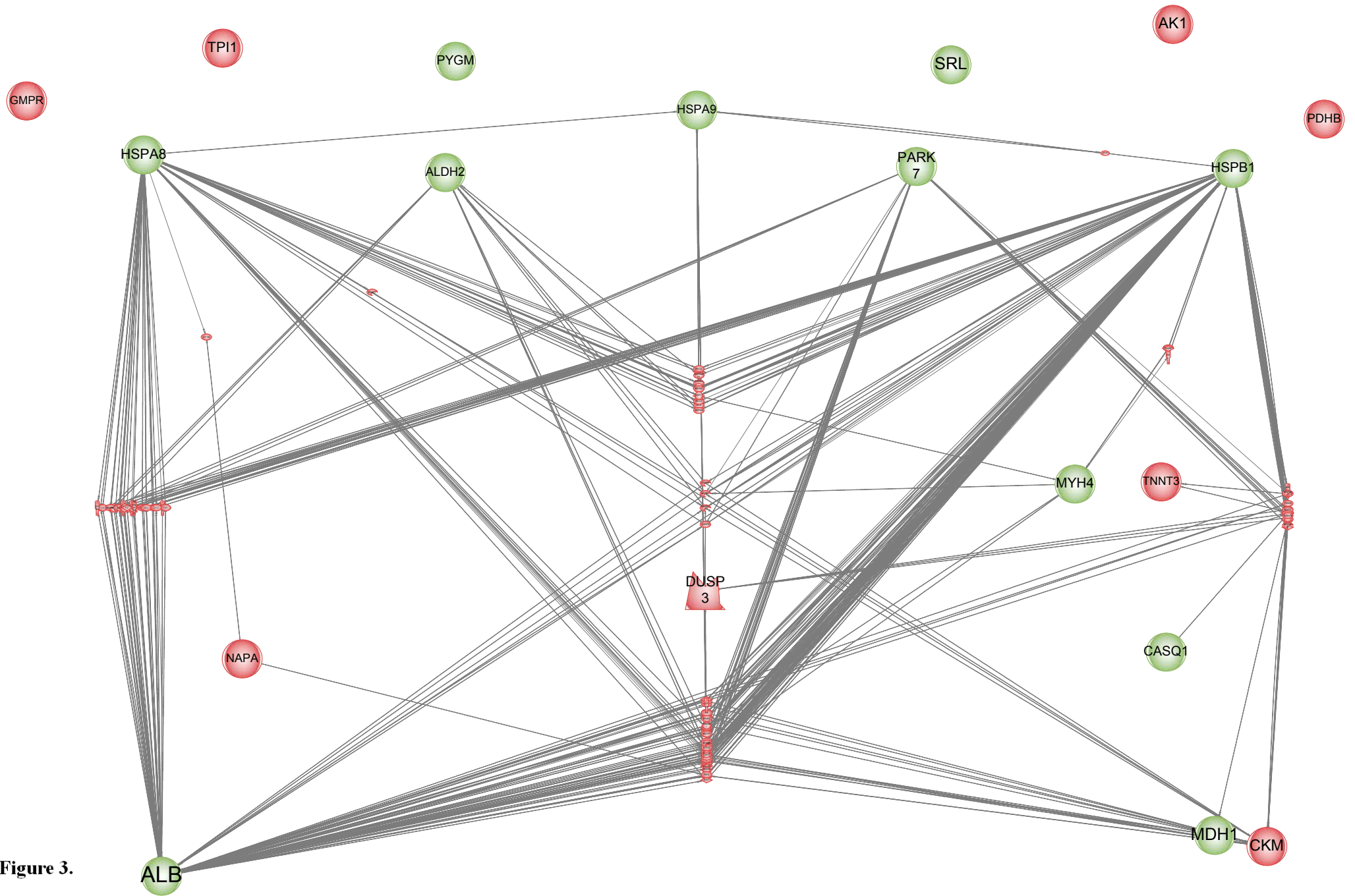


Figure 3.

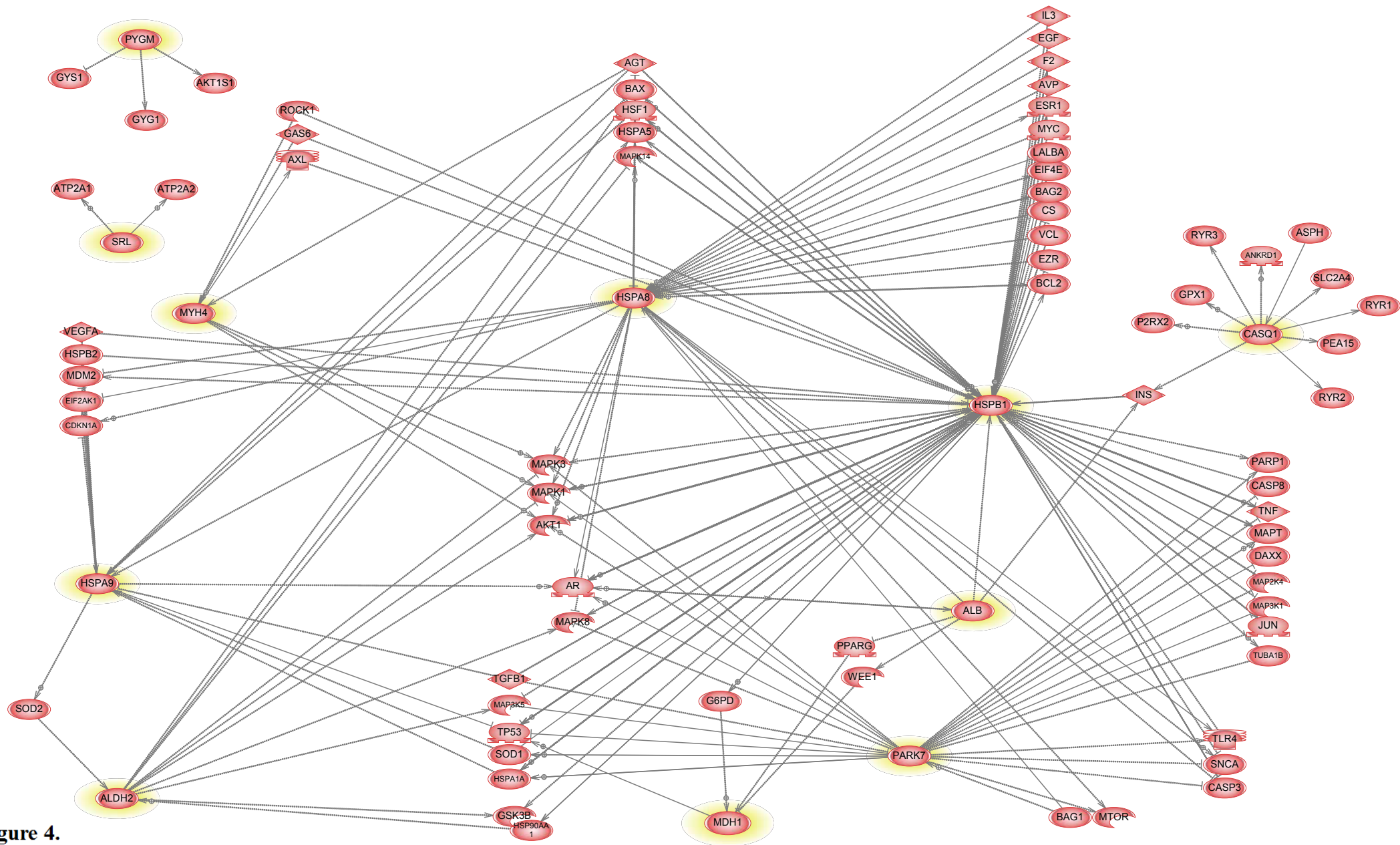
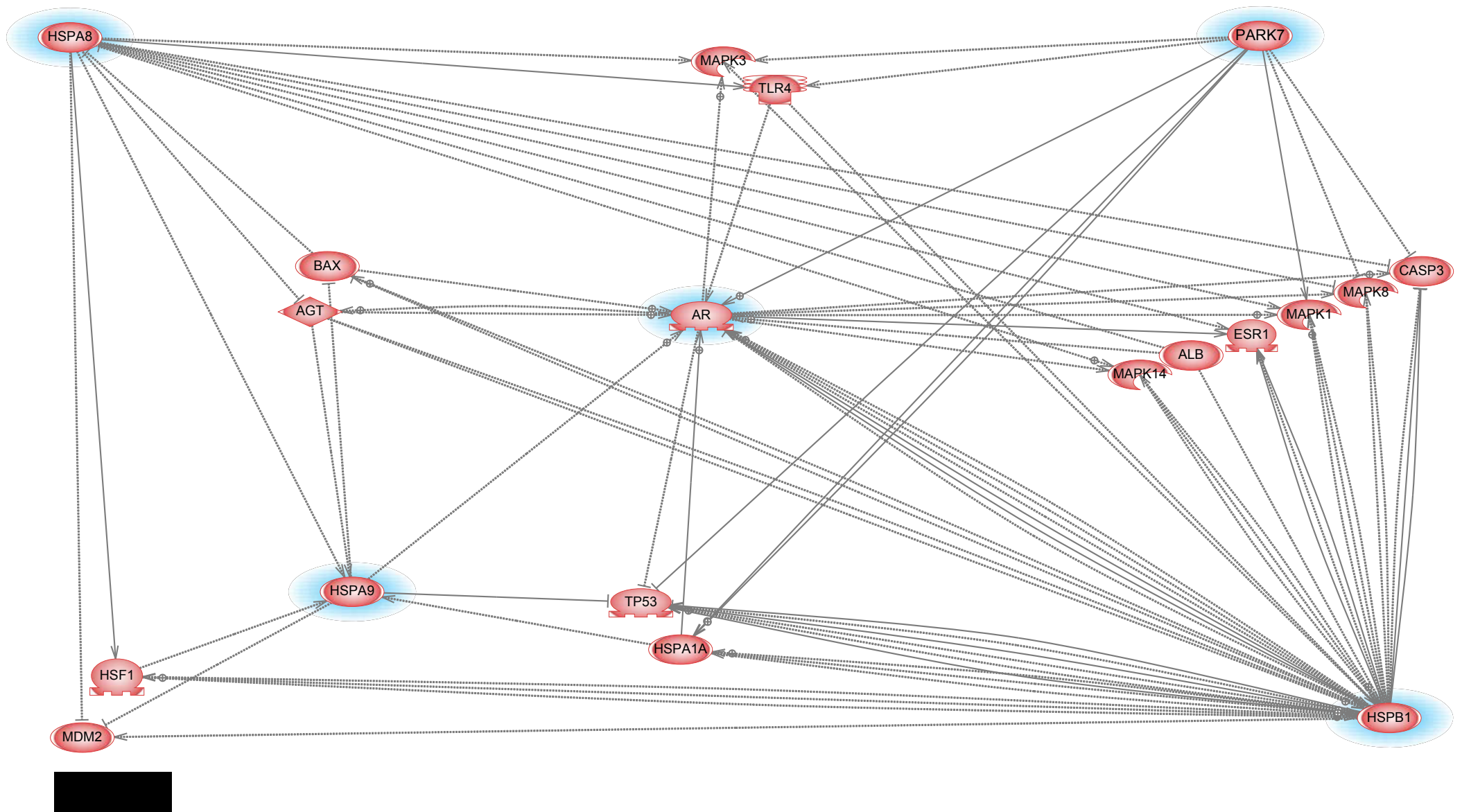
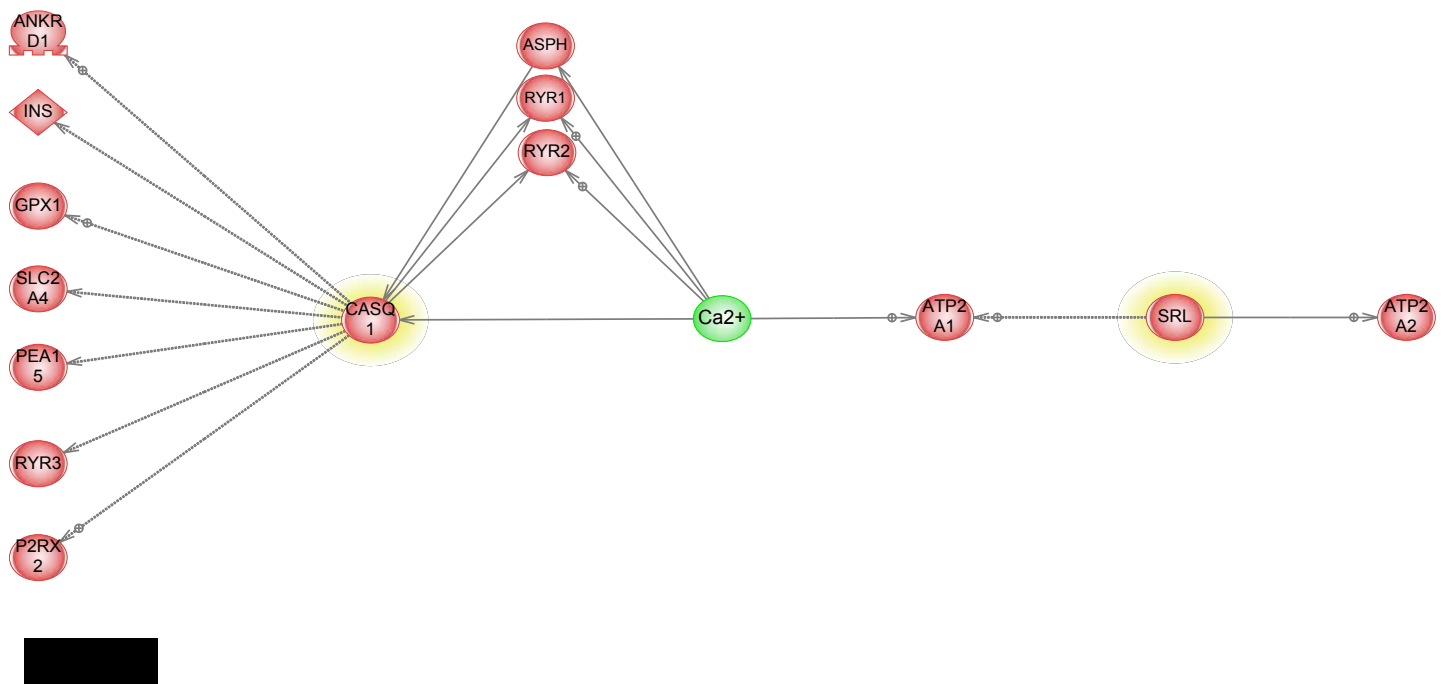


Figure 4.





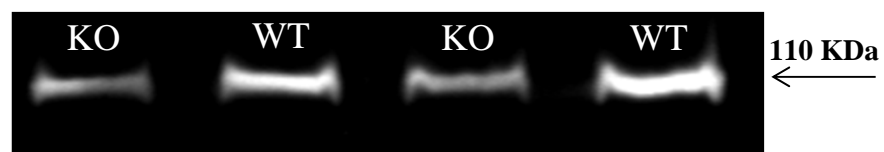


Figure 7.

Conclusion

Comme attendu, cette étude combinant deux approches (Protéomique et Bio-informatique) a permis de révéler une signature moléculaire associée à l'inactivation de la Hsp27. Cette démarche est complémentaire de celle réalisée dans la publication 3. Une nouvelle liste de protéines cible du KO HspB1 a été mise en évidence.

L'originalité de ces résultats est d'avoir complété les connaissances sur l'effet de l'absence de Hsp27 dans le muscle glycolytique qui s'était révélé peu sensible au KO selon les critères analysés précédent. De plus un réseau construit à partir de ces données indique que le récepteur aux androgènes (Ar) est interconnecté à HspB1 et à plusieurs de ces protéines cibles Ceci suggère qu'en l'absence de Hsp27, le muscle *Tibialis anterior* serait moins réactif aux androgènes. Afin de compléter cette étude une validation ultérieure sur le muscle *Soleus* sera effectuée. Cette étude a permis aussi d'enrichir la caractérisation du phénotype musculaire des souris KO HspB1 d'un point de vue moléculaire.

Discussion générale
Conclusions et Perspectives

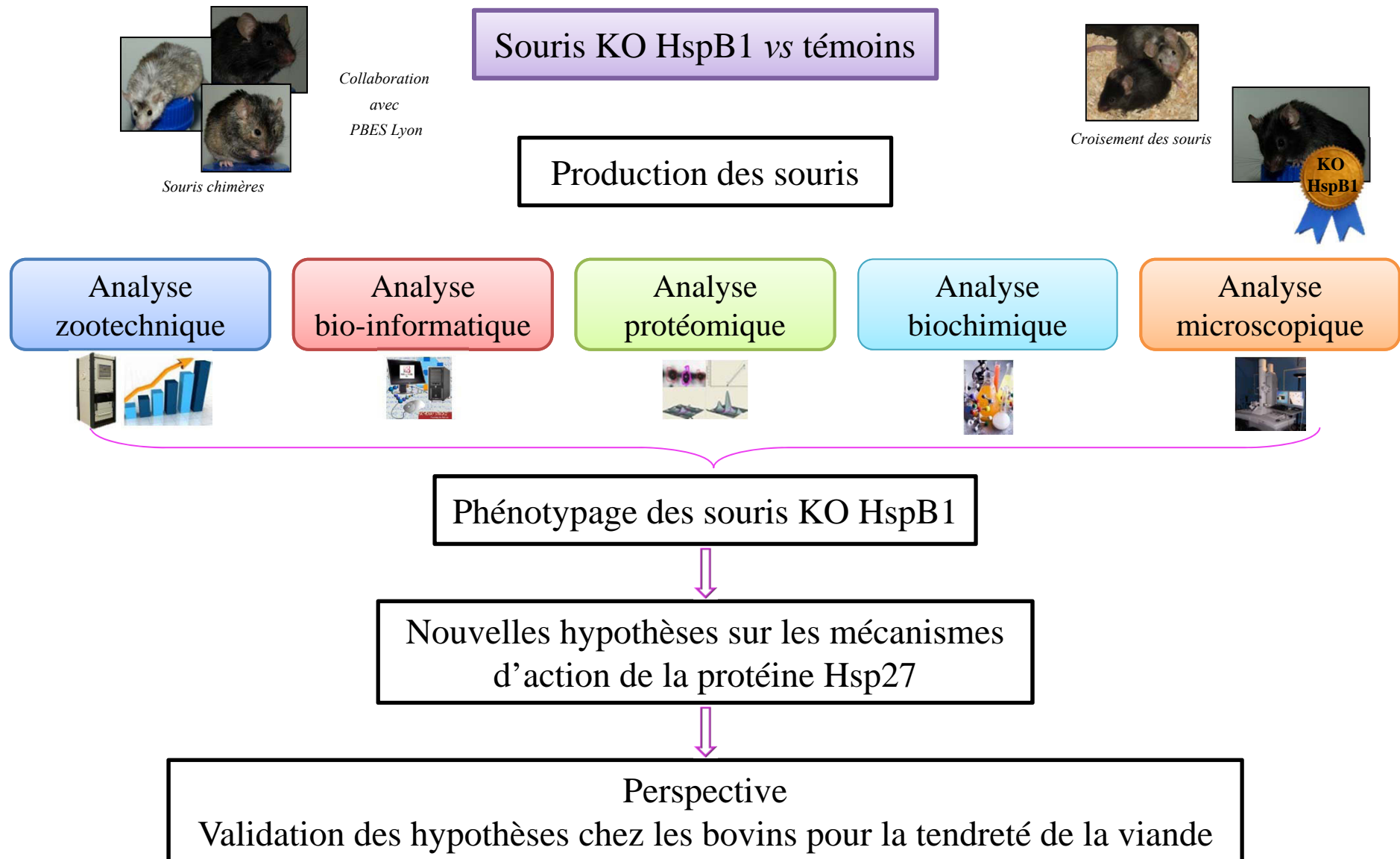


Figure 22. Les différentes approches suivies au cours de mes travaux de thèse

Cette démarche originale combinant différentes approches à permis de dégager de nouvelles hypothèses sur les mécanismes d'action de la protéine Hsp27. Une validation de ces hypothèses et mécanismes sera effectué ultérieurement sur le bovin, en relation avec la tendreté.

L'objectif de cette thèse était d'analyser le rôle d'une protéine mise en évidence comme marqueur de tendreté de la viande bovine, la Hsp27. Une manière d'aborder cette analyse était de réaliser une étude fonctionnelle *in vivo* chez une espèce modèle, la souris présentant une inactivation (KO) du gène HspB1 codant la Hsp27. L'originalité de la démarche était double. Le modèle de souris KO devait être utilisé pour comprendre l'effet de l'absence de la protéine sur le développement de la souris, notamment des tissus liés à la qualité (muscle, et tissus adipeux). D'autre part, il devait permettre de valider les hypothèses issues d'analyses *in silico* au moyen de la bio-informatique. Les données issues de cette étude devaient permettre d'établir des hypothèses à valider ultérieurement chez l'espèce cible, le bovin.

Au début de ce travail, il existait surtout des données rapportant un effet de l'inactivation de Hsp27 sur la croissance et la physiologie cellulaire *in vitro*. Une seule étude concernait l'influence de l'inactivation constitutive du gène chez la souris (Huang *et al.*, 2007). Cette étude démontrait que le KO n'était pas létal et n'altérait pas le développement des souris. Si l'objectif initial du projet « Phénotypage des animaux modèles » était de produire des souris présentant un KO conditionnel de HspB1, il s'est avéré que les cellules ES disponibles pour ce projet ne permettait que de générer des souris porteuses d'un KO constitutif. Pour apporter des éléments complémentaires à celles obtenues par Huang et al (2007), nous avons choisi de réaliser leur phénotypage à différentes échelles, depuis l'échelle macroscopique jusqu'à l'échelle moléculaire et microscopique (Figure 22).

I. Phénotype macroscopique des souris KO HspB1 : Hsp27 et développement

Le phénotype macroscopique des souris KO HspB1 a été caractérisé par une analyse de la croissance (poids corporel et vitesse de croissance), de la composition corporelle et des paramètres sanguins. *Les souris KO HspB1 sont viables, fertiles et ne présentent pas d'anomalies apparentes.* Ces résultats sont en accord avec les données obtenues dans la même espèce (Huang *et al.*, 2007) ainsi que chez le Xénope (Brown *et al.*, 2007) et le poisson zèbre (Middleton and Sheldon, 2013). Elles indiquent l'existence d'une redondance fonctionnelle entre les Hsps dans le contexte général du développement. Il est à noter les souris dépourvues HspB5 (α B crystalline) sont, elles-aussi, viables mais meurent prématurément avec une sévère perte de muscle (Ito *et al.*, 2001). Les souris présentant la double inactivation HspB5 et HspB2, deux protéines fortement exprimées dans le cœur, ne se distinguent pas des souris de

type sauvage du même âge, suggérant que ni HspB5 ni HspB2 ne sont essentiels pour le développement du myocarde (Brady *et al.*, 2001; Morrison *et al.*, 2004). Même le KO triple pour les trois principales sHsps du muscle (HspB1/HspB5/HspB2) n'induit pas d'altération apparente de développement. Cependant les souris meurent au début de l'âge adulte après avoir développé une dégénérescence musculaire sévère (Huang *et al.*, 2007). Ces résultats confortent l'hypothèse que les sHsps sont nécessaires au maintien des fonctions musculaires dans des conditions physiologiques.

Dans notre lignée KO HspB1, les souris présentent un format plus petit (poids et taille) que leurs témoins. Cette différence de format n'est plus observée à 12 et 18 mois d'âge. Il est toutefois difficile d'en conclure un rôle de HspB1 sur la croissance car le nombre de souriceaux par portée était plus élevé chez les souris KO HspB1. Aussi les différences de format observées peuvent soit être la conséquence de cette taille de portée plus élevée associée à des nouveau-nés plus petits, ou soit provenir d'une régulation différente du développement du squelette et des muscles chez les souris KO HspB1.

La vitesse de croissance (GMQ) des souris mesurée jusqu'à 12 semaines n'a pas révélé de différence significative entre les deux génotypes. Toutefois, le fait que les différences de format ne soient plus observées à partir de 12 mois laisse supposer que les souris KO HspB1 ont eu un GMQ supérieur entre 12 semaines d'âge et 12 mois. Afin de confirmer cette hypothèse il faudrait suivre l'évolution du GMQ après 12 semaines. D'autre part, nous ne disposons pas d'information sur la prise alimentaire des animaux et sur leur métabolisme. Un suivi en cage métabolique pourrait nous permettre de recueillir ces éléments et notamment de vérifier si des différences de prise alimentaire ne sont pas susceptibles d'induire un GMQ plus élevé.

Puisque les différences de format sont observables dès le début de la vie postnatale, elles sont probablement la conséquence de phénomènes mis en place dès la vie fœtale, ce que nous n'avons pas encore examiné. En accord avec l'hypothèse que la taille plus petite des souris serait une conséquence du KO HspB1, une étude a montré que l'Hsp27 non phosphorylée semble agir comme un régulateur positif de la calcification osseuse (Kato *et al.*, 2011) ce qui suggère qu'elle pourrait moduler la croissance osseuse. D'autre part, Hsp27 est une chaperone du récepteur des œstrogènes qui joue un rôle sur le développement du squelette, notamment au cours de la vie fœtale (BenHur *et al.*, 1997). Un examen des squelettes des souris après

fixation et coloration du cartilage et des os devrait nous permettre de rechercher des différences de structure ou d'ossification liées à l'absence de Hsp27.

Enfin, le fait que le nombre de souriceaux par portée soit supérieur chez les souris KO laisse penser à un effet de HspB1 sur leur prolificité. Toutefois, la prolificité des souris témoins était inférieure à celle généralement observée dans la lignée Bl6C57 (n=7 à 8), ce qui ne nous permet pas de conclure. Un comptage des spermatozoïdes chez les mâles KO HspB1 vs témoins à 12 semaines suggère que le nombre de spermatozoïdes est plus élevé chez les souris KO HspB1. Ceci est en faveur d'une fertilité supérieure des mutants. Il est cependant nécessaire de réaliser des analyses supplémentaires (âge à la puberté, taux hormonaux, ...) afin de pouvoir conclure.

Ainsi, l'absence de Hsp27 induit un phénotype macroscopique peu marqué, caractérisé par un format plus petit, qui disparaît avec l'âge.

II. Phénotype musculaire : redondance des sHsps dans le muscle

Au cours de cette thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au tissu musculaire des animaux, précurseur de la viande. L'analyse des tissus adipeux sera abordée ultérieurement dans l'équipe. De nombreux auteurs s'accordent à prédire que l'absence de Hsp27 est susceptible d'induire des pathologies neuromusculaires (pour revue de Wettstein *et al.*, 2012). Cependant, l'observation régulière des souris KO HspB1 dans leur cage n'a révélé aucun problème de locomotion ou de comportement. Ces dernières ne présentent pas de symptômes apparents de pathologie musculaire (myopathie) ni de troubles neurologiques. On peut supposer l'existence de phénomènes de compensation par les autres membres des Hsps ou mêmes par d'autres protéines afin de pallier l'absence de Hsp27 (cf paragraphe III).

L'analyse effectuée sur les muscles squelettiques des souris n'a montré aucune différence entre les deux génotypes en ce qui concerne :

- le poids des muscles *Soleus*, *Tibialis anterior* et *Gastrocnemius*,
- leurs caractéristiques histologiques,
- la classification immunohistochimique des fibres musculaires.

Cependant *une tendance à un nombre supérieur de fibres de petite taille* dans les muscles *Soleus* et *Tibialis anterior* a été détectée chez les souris KO HspB1. Cette tendance est soit

liée au format inférieur des souris KO HspB1, soit à un retard de développement musculaire de ces souris. En accord avec cette dernière hypothèse, la séparation des isoformes de chaîne lourde de Myosine (MyHC) par électrophorèse a révélé des différences de profils entre les deux génotypes dans le muscle *Soleus*. La cinétique d'évolution des MyHC à 4, 8, 12 semaines et 12 mois laisse supposer que l'isoforme de MyHC observée chez les souris KO correspondrait à une isoforme développementale présente chez les souris témoins uniquement à 4 semaines d'âge.

Ainsi, l'absence de la protéine Hsp27 pourrait induire un retard de développement musculaire, observable après la naissance. Des analyses complémentaires (suivi détaillé de la mise en place des protéines myofibrillaires) sont nécessaires afin de valider cette hypothèse. Le fait que les souris KO et leur muscle ne présentent pas d'anomalies majeures ni de différences dans leur type contractile et métabolique permet de supposer que l'absence de HspB1 est compensée par l'activité d'autres protéines.

III. Phénotype moléculaire : des variations subtiles et muscle-spécifiques

Au niveau moléculaire, ce travail a clairement identifié une relation entre l'absence de Hsp27 et des modifications des profils protéiques dans les muscles. De plus, il a mis en évidence une relation entre les conséquences de l'absence de Hsp27 et le type du muscle, démontrant *un effet muscle-spécifique de Hsp27*. A titre d'exemple, les interacteurs de HspB1 révélés par l'approche bio-informatique ont montré une abondance différente entre les deux génotypes uniquement dans le muscle oxydatif *Soleus*. Ceci est probablement dû à la forte abondance des Hsps dans les muscles oxydatifs démontrée dans plusieurs espèces. Chez le bovin par exemple, l'abondance de la plupart des Hsps est plus élevée dans le muscle *Longissimus thoracis* (lent oxydatif) que dans le muscle *Semitendinosus* (rapide glycolytique) (Guillemin *et al.*, 2011b). Nos données histologiques confirment par ailleurs que l'expression du gène rapporteur β galactosidase, sous contrôle du promoteur HspB1, est plus élevée dans les fibres oxydatives comparativement aux fibres oxydo-glycolytiques et glycolytiques.

Modification du statut en Hsps. Parmi les protéines dont l'abondance a été modifiée en réponse à l'inactivation de HspB1 figurent des Hsps. Une augmentation de l'abondance de Hsp90aa1 et Hsp70a1a a été détectée dans le *Soleus* des KO HspB1. Au niveau du *Tibialis anterior*, aucune différence significative entre les deux génotypes n'a été détectée pour ces deux protéines. Cependant, une diminution de l'abondance de la GRP75 et Hsp70a8 (deux

Tableau 3. Effet de l'absence de la protéine Hsp27 sur les autres membres de la famille des Hsps en fonction du type du muscle

	<i>Soleus</i> Oxydatif	<i>Tibialis anterior</i> Oxydo-glycolytique
Hsp90aa1	↗	NS
Hsp70a1a	↗	NS
α -B crystalline	↗	NS
Hsp20	↘	NS
Hsp70-8	A valider	↘
Grp75	A valider	↘

↗ Augmentation de l'abondance chez les souris KO HspB1

↘ Diminution de l'abondance chez les souris KO HspB1

NS : Effet non significatif

membres de la famille des Hsp70), révélée par l'analyse protéomique, a été confirmée dans ce même muscle. L'abondance de la Grp75 et de la Hspa8 reste à examiner dans le muscle *Soleus*. Concernant les petites chaperonnes, alors qu'une augmentation de la α B-Crystalline et une diminution de la Hsp20 ont été mises en évidence dans le muscle *Soleus*, aucun changement n'a été détecté dans leur abondance au niveau du muscle *Tibialis anterior*. Ces données suggèrent, d'une part, que les souris KO HspB1 pourraient s'adapter à l'absence de la protéine Hsp27 par un *phénomène de compensation lié à des changements de l'expression des autres Hsps* (Tableau 3). La compensation est d'autant plus envisageable que la Hsp20 (HspB6) et l' α B crystalline (HspB5) sont capables d'interagir entre elles (Arrigo, 2005). D'autre part, ce phénomène dépendrait du type de muscle, sans doute en relation avec les niveaux d'expression basale de ces protéines.

L'expression ou l'induction des Hsps requiert l'activation et la translocation dans le noyau d'un facteur de transcription, Hsf1 « Heat shock factor ». Celui-ci reconnaît alors des séquences spécifiques, présentes en copies multiples dans le promoteur d'un gène Hsp, les Hse « Heat shock elements » (Koizumi *et al.*, 2013). Hsf1 fonctionne comme un activateur transcriptionnel, notamment lors de stress, et module la transcription des gènes de Hsps inductibles (Hsp27, Hsp70 et Hsp90) (Xia *et al.*, 2012). Dans les conditions physiologiques, la forme monomérique de Hsf1 est maintenue dans un état inerte par une liaison à Hsp70 et Hsp90. Lors de stress le recrutement cellulaire de Hsp70 pour prévenir l'agrégation de protéines endommagées libère Hsf1, qui est alors trimérisé et ainsi activé. Il a été proposé qu'un mécanisme de rétroaction négatif inactive Hsf1 en lui faisant retrouver son état initial (Pirkkala *et al.*, 2000). Ce mécanisme de rétroaction négatif est orchestré par Hsp27 (Simioni *et al.*, 2009). Par conséquent, en absence de Hsp27, Hsf1 est probablement activé de façon basale, ce qui aurait pour conséquence un niveau d'expression plus élevé des gènes de Hsps. Une hypothèse à explorer pour la réponse muscle spécifique observée en réponse au KO HspB1 est une abondance différente du facteur Hsf1. Une autre hypothèse à considérer est l'existence de différences d'abondance du facteur Hsf2 non inductible par le stress mais activé au cours du développement et de la myogenèse (McArdle *et al.*, 2006).

Modification de la voie apoptotique. Il est intéressant de noter que certaines protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose ont été aussi prédites par l'analyse bio-informatique comme des cibles de la protéine Hsp27. L'analyse par Western-blotting a confirmé une augmentation de l'abondance des protéines pro apoptotiques (Caspase 3 et Fas)

au niveau du muscle *Soleus* en l'absence de Hsp27. Ainsi, nos données suggèrent que l'absence de Hsp27 (et la diminution de l'abondance de Hsp20) induiraient *une stimulation de la voie apoptotique dans ce muscle chez les souris KO HspB1*. Ceci est en accord avec le rôle anti-apoptotique bien documenté de la Hsp27 (Vidyasagar *et al.*, 2012).

Cette protéine séquestre les facteurs pro-apoptotiques tels que Bax et Bcl, et inhibe la formation de l'apoptosome (Concannon *et al.*, 2003) (Figure 23). D'autres études ont montré que la surexpression de Hsp27 et de Hsp20 empêche la libération du cytochrome c et l'activation des Caspase 9 et 3 ayant un rôle central dans l'apoptose (Fontaine *et al.*, 2005). Nos données indiquent que cette action s'exercerait à des niveaux différents du processus apoptotique (récepteur : Fas, effecteur : Caspase 3, et inhibiteur : IKK- α / Chuk). D'autre part, l'abondance des deux facteurs de traduction Eif4E et Eif4G est augmentée dans le m. *Soleus* des souris KO HspB1. Or Li *et al.* (2003) ont montré que la surexpression de Eif4E protège la cellule contre l'apoptose en inhibant la libération de cytochrome c de la mitochondrie. L'augmentation de Eif4E (et Eif4G) chez les KO HspB1 pourrait constituer un mécanisme compensateur, par lequel la traduction est activée pour atténuer la stimulation de la voie apoptotique et permettre aux cellules de survivre en l'absence de Hsp27.

A l'inverse, l'abondance de la Caspase 3 a diminué dans le muscle *Tibialis anterior* des souris KO HspB1. Cependant, l'analyse protéomique de ce muscle confirme la stimulation de la voie apoptotique *via* la diminution de l'abondance des protéines Hspa8 et Park7. Hspa8 exerce un effet anti-apoptotique en inhibant l'activation de la Caspase3 et du cytochrome c (Gotoh *et al.*, 2001). Une diminution de Hspa8 chez les souris KO HspB1 pourrait contrecarrer son effet négatif sur la Caspase3. Park7 exerce une cytoprotection par l'inhibition de la voie p53-Bax-Caspase (Fan *et al.*, 2008). La surexpression de Park7 provoque une diminution de l'expression de Bax et inhibe ainsi l'activation des Caspases. A l'inverse, le KO Park7 augmente l'abondance de Bax et accélère l'activation de la Caspase 3 et ainsi l'apoptose. Les effets anti-apoptotiques de la Park7 sur l'apoptose sont associés à sa capacité à diminuer le niveau de Bax par l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de p53 (Fan *et al.*, 2008). Ainsi, l'apoptose pourrait donc être stimulée aussi dans le muscle *Tibialis anterior* des souris KO HspB1 mais par d'autres chemins que dans le muscle *Soleus*.

Afin de vérifier si l'absence de Hsp27 est bien associée à une stimulation de la voie apoptotique chez les souris KO HspB1, il serait intéressant d'utiliser la méthode de TUNEL

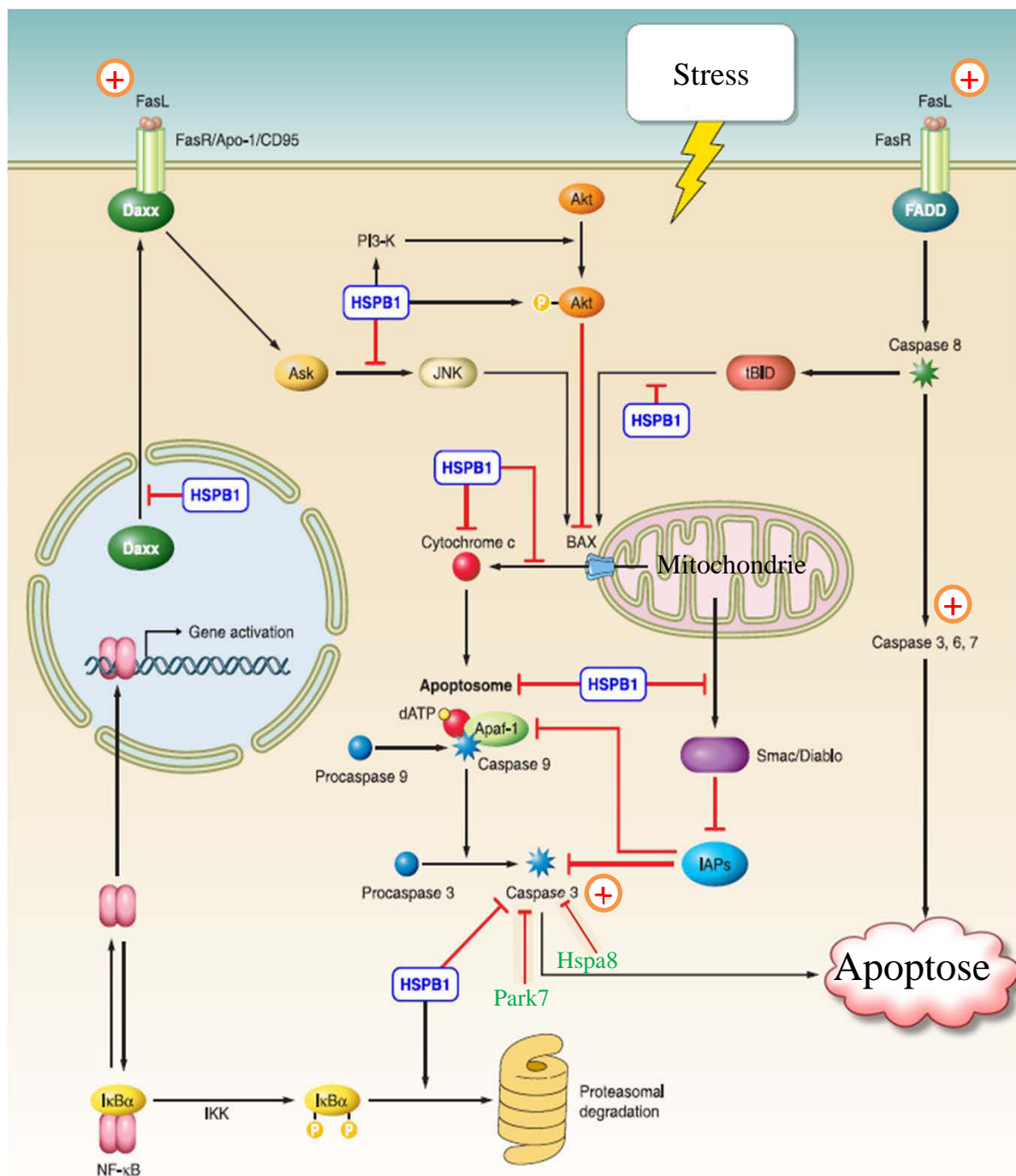


Figure 23. Implication de Hsp27 dans les voies apoptotiques

HSPB1 = Hsp27

Adapté de Mymrikov et al., 2011

- | Effet négatif
- Effet Positif
- ⊕ Augmentation de l'abondance chez les KO HspB1

(Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) pour quantifier le nombre de noyaux apoptotiques dans les muscles suite à l'invalidation du gène codant Hsp27.

Modulation du calcium musculaire. Les résultats de l'analyse protéomique du muscle *Tibialis anterior* ont révélé une modification probable de la régulation des flux de calcium (Ca^{2+}). En effet, cinq spots de la protéine Sarcalumenin (Srl) ont été détectés comme différentiels par notre analyse protéomique comparative entre les souris KO HspB1 et leurs témoins. Srl a été caractérisée par une forte affinité de liaison au Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique où elle le mettrait en réserve (Leberer *et al.*, 1990). Il est probable que l'augmentation de son abondance dans le muscle des souris KO HspB1 induise une diminution du Ca^{2+} libre. Ceci pourrait avoir des conséquences sur les flux de calcium dans les cellules musculaires et, par voie de conséquence, sur les activités des protéines calcium-dépendantes. Nous avons aussi mesuré un taux plus faible de Ca^{2+} plasmatique chez les souris KO HspB1. Cependant le lien avec le Ca^{2+} musculaire est difficile à interpréter.

Modification de l'abondance du récepteur des androgènes. Un sous-réseau issu de l'analyse des données du protéome réalisée avec Pathway studio comporte le récepteur aux androgènes (Ar) à un carrefour entre HspB1 et plusieurs protéines cibles comme la Hsp90, Hsp70 et Park7. Les résultats de Western-blotting montrent une diminution de l'abondance des Ar en l'absence de Hsp27 dans le muscle *Tibialis anterior*. Ceci reste encore à examiner dans le muscle *Soleus*. L'interaction entre Hsp27 et la voie de signalisation des androgènes a été décrite. Cette protéine a été identifiée comme une chaperonne du récepteur Ar (Zoubeidi *et al.*, 2007). Ces auteurs ont montré que la translocation nucléaire des Ar et leur liaison aux ARE (Androgen Responsive Elements) sont diminuées en l'absence de Hsp27. Ceci suggère que Hsp27 régule l'activité de Ar. De plus, une étude récente a montré que la diminution de l'expression de Hsp27 induite par un siRNA s'accompagne d'une diminution de l'ARNm Ar (Stope *et al.*, 2012). La diminution de l'abondance protéique des Ar chez les KO HspB1 est donc susceptible d'altérer la réponse du muscle aux androgènes, mais également l'activation de gènes musculaires dépourvus de séquences ARE comme le gène codant l' α -Actine (Vlahopoulos *et al.*, 2005). Ceci pourrait avoir des conséquences sur la synthèse des protéines musculaires.

L'association d'une étude ciblée des protéines candidates révélées par analyse bio-informatique s'appuyant sur des données publiées et prouvées expérimentalement et

d'analyses protéomiques a permis d'analyser l'impact de l'inactivation du gène HspB1 sur les profils protéiques dans les muscles. L'utilisation de deux muscles de type extrême (oxydatif vs glycolytique) a montré des réponses muscle-spécifique, l'impact de l'inactivation de HspB1 sur ses interacteurs connus étant beaucoup plus marqué dans le muscle oxydatif Soleus. Toutefois, la recherche sans a priori de protéines dont l'abondance est modifiée en l'absence de Hsp27 dans le muscle glycolytique a révélé d'autres protéine cibles impliquées dans différentes voies biologiques (ex : régulation du calcium intracellulaire, signalisation des androgènes).

IV. Phénotype ultra-structural : Hsp27 et architecture myofibrillaire

Une démarche originale de ce travail de thèse est d'avoir utilisé la technique de microscopie électronique à transmission afin d'étudier l'ultrastructure du muscle des souris (phénotypage fin). Pour réaliser cette étude nous avons choisi le muscle *Soleus* dans un premiers temps car nos premiers résultats avaient démontré une réponse de ce muscle à l'absence de Hsp27. Les analyses sur le muscle *Tibialis anterior* seront réalisées ultérieurement.

Au niveau ultrastructural, les fibres des animaux KO HspB1 sont caractérisées, comparativement à celles des témoins, par *un appareil contractile musculaire moins organisé* nettement observable dans certaines zones du muscle et *qui devient très déstructuré après 72h post-mortem*. Ainsi, le phénotype musculaire fin des souris KO HspB1 est altéré, sans induire de troubles musculaires apparents. Ces résultats soulignent le rôle important de la Hsp27 dans l'organisation du cytosquelette et son implication dans l'entretien du réseau de cytosquelette du muscle. Ils sont en accord avec l'observation, chez le Xénope, d'anomalies dans l'architecture myofibrillaire dans le cœur et les muscles squelettiques (Brown *et al.*, 2007), caractérisées par des altérations des myofibrilles et des défauts de formation des sarcomères. Par conséquent, une fonction primaire de Hsp27 pourrait être de réguler finement la structure myofibrillaire. Les analyses par Western-blotting ont montré *une diminution de l'abondance de la Desmine et de l' α -Actine chez les souris KO HspB1*. Hsp27 joue un rôle très important dans la stabilisation de l'Actine avec qui elle interagit principalement (Arany *et al.*, 2012). Hsp27 interagit aussi avec les filaments de Desmine pour les protéger en cas de stress lié à l'exercice (Paulsen *et al.*, 2009). Des niveaux élevés de Hsps dans le tissu musculaire sont nécessaires pour prévenir les dommages cellulaires dans des conditions de stress. Elles jouent notamment un rôle important dans la protection de l'appareil contractile (Huang *et al.*, 2007).

D'autre part, les Caspases dégradent des centaines de protéines différentes (Nakanishi *et al.*, 2001), dont les protéines assurant la cohésion des myofibrilles, telles que la Desmine. Dans le muscle *Soleus* des souris KO HspB1, où une augmentation de l'abondance de la Caspase 3 a été mise en évidence, la Desmine et d'autres protéines clés pour l'organisation structurale des myofibrilles (exp : vimentine) seraient donc des cibles privilégiées pour la dégradation par cette enzyme (Chen *et al.*, 2003). Ceci suggère que la diminution de la Desmine dans ce muscle est probablement une conséquence de l'augmentation de l'abondance de la Caspase 3. De plus, la dégradation de l' α -Actine a souvent été associée à l'apoptose (Kayalar *et al.*, 1996; Mashima *et al.*, 1995) et les fragments d'Actine ont été proposés comme de bons marqueurs du développement de l'apoptose au niveau musculaire (Becila *et al.*, 2010). Dans le muscle *Tibialis anterior*, il ne peut être exclu que la diminution de l' α -Actine soit liée à l'apoptose. Une analyse des fragments de cette protéine pourrait apporter des informations supplémentaires. Les conséquences sur l'ultrastructure de ce muscle seront recherchées par microscopie électronique.

La désorganisation des myofibrilles était accentuée après 72 heures *post-mortem* dans le muscle des souris KO HspB1. Cette observation est en faveur d'une « tendreté » plus élevée des muscles des souris KO HspB1.

Les résultats obtenus chez les souris KO suggèrent que l'appareil contractile de ces dernières (à thermo-neutralité et sans stress appliqué) est très fragile et moins résistant à la dégradation post-mortem. En effet l'ensemble de nos résultats nous laissent supposer que les phénomènes d'apoptose et de protéolyse calcium-dépendante seraient plus accentués chez les souris KO HspB1 (à valider par des analyses ultérieures). D'autre part, cette étude confirme bien le rôle de la protéine Hsp27 dans la protection du cytosquelette musculaire et le maintien de la l'organisation de l'appareil contractile.

Contrairement à ce qui a été observé pour les caractéristiques macroscopiques des souris et des muscles, aucun phénomène de compensation de l'absence de HspB1 ne semble exister pour les propriétés ultra-structurales. Ces données permettent de supposer que le « phénotype fin » du muscle des souris est dépendant de l'expression constitutive de HspB1. Cette dernière semble être importante pour l'organisation myofibrillaire. Ces résultats montrent aussi que chaque Hsp peut avoir des fonctions spécifiques.

V. Hsp27 et tendreté

L'objectif de ce travail de thèse était d'établir des hypothèses concernant les mécanismes d'action de Hsp27 et ses interacteurs ou ses protéines cibles dans la tendreté de la viande. Le modèle murin m'a permis d'analyser les conséquences fonctionnelles de l'absence de Hsp27 et d'en dégager des hypothèses pour le déterminisme de la tendreté à valider ultérieurement chez le bovin. L'intégration des différentes données a permis de dégager les principales fonctions cellulaires dans lesquelles la Hsp27 est impliquée dans le muscle. La Hsp27 exerçant des effets pléiotropiques (Arrigo, 2013), il reste à déterminer si ces actions sont directes ou indirectes (par exemple sur la croissance). Les données obtenues chez la souris KO HspB1 suggèrent (*) ou démontrent (**) l'implication de la Hsp27 dans :

- Le développement et la croissance fœtale (détermination du format) (*)
- Le maintien de l'ultrastructure musculaire (**)
- La régulation de la voie apoptotique (*)
- l'homéostasie cellulaire, notamment calcique (*)
- La protection contre le stress oxydatif (*)

Ainsi, ce travail de thèse a enrichi les connaissances sur les mécanismes d'action de la Hsp27 *en révélant des voies biologiques modulées en réponse à l'inactivation du gène HspB1*. Elles permettent de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la relation entre l'expression ou l'abondance de Hsp27 et la tendreté. Cette qualité dépend des propriétés des muscles (teneurs en lipides et collagènes, type contractile et métabolique, et organisation structurale), qui à elles seules ne suffisent à expliquer sa variabilité. Après l'abattage, le muscle va être progressivement privé d'oxygène et de nutriments, ainsi la production d'énergie va être réduite. Afin de maintenir leur homéostasie les cellules musculaires ont besoin de régénérer les molécules d'ATP, et en conséquence de l'arrêt d'approvisionnement en oxygène, la production d'ATP sera possible uniquement par la voie glycolytique qui est peu efficace. Le glycogène métabolisé va induire une production de lactate dont l'accumulation dans la cellule musculaire provoque une chute de pH de 7,2 jusqu'à un pH ultime de 5,4-5,7. Cette chute de pH est plus rapide dans les fibres glycolytiques utilisant la voie anaérobie pour la production d'énergie. D'autre part, la diminution d'ATP induit une diminution de l'activité des ATPases sarcoplasmiques conduisant à une augmentation des ions calcium libres dans le *reticulum*. Toutes ces modifications métaboliques vont induire un stress

oxydant, la production d'Hsps et l'activation de systèmes protéolytiques notamment calcium-dépendants. Dans les muscles oxydatifs, les réserves en ATP vont être rapidement épuisées, donc les conséquences de l'entrée en anoxie seront plus rapides. De plus le statut antioxydant de ces muscles est plus élevé que celui des muscles glycolytiques. On peut donc supposer que la production de sHsps sera plus importante dans ce type de muscle. Dans les muscles glycolytiques, la chute de pH est plus rapide et donc les flux de calcium intra cellulaires vont être modifiés plus rapidement. Ainsi, les enzymes dont l'activité est calcium-dépendante (Caspases, Calpaïnes) seront actives plus rapidement. Nous émettons donc l'hypothèse que *dans les muscles oxydatifs, les sHsps (constitutives et induites post-mortem) jouent un rôle crucial dans l'installation de la tendreté* par leur action anti-apoptotique et de protection des protéines de structure. Ainsi, la phase d'apoptose *post-mortem* pourrait être plus longue dans ces muscles. En revanche, dans les muscles glycolytiques la phase d'apoptose serait plus courte. Ceci pourrait expliquer les différences dans le sens des relations entre l'abondance des biomarqueurs, Hsp27 notamment, et la tendreté observées entre muscles chez les bovins.

Références bibliographiques

1. AFNOR, 2010. Analyse sensorielle - Guide général pour l'évaluation sensorielle - Description, différenciation et mesure hédonique. XP V 09-501
2. Agarkova, I., Perriard, J.C., 2005. The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends in Cell Biology* 15, 477-485.
3. Arany, I., Clark, J.S., Reed, D.K., Ember, I., Juncos, L.A., 2012. Cisplatin Enhances Interaction between p66Shc and HSP27: Its Role in Reorganization of the Actin Cytoskeleton in Renal Proximal Tubule Cells. *Anticancer Research* 32, 4759-4763.
4. Arrigo, A.P., 2005. Heat shock proteins as molecular chaperones. *M S-Medecine Sciences* 21, 619-625.
5. Arrigo, A.P., 2013. Human small heat shock proteins: Protein interactomes of homo- and hetero-oligomeric complexes: An update. *FEBS Lett* 587, 1959-1969.
6. Arrigo, A.P., Virot, S., Chaufour, S., Firdaus, W., Kretz-Remy, C., Diaz-Latoud, C., 2005. Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 414-424.
7. Balcerzak, D., Querengesser, L., Dixon, W.T., Baracos, V.E., 2001. Coordinate expression of matrix-degrading proteinases and their activators and inhibitors in bovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science* 79, 94-107.
8. Baranova, E.V., Weeks, S.D., Beelen, S., Bukach, O.V., Gusev, N.B., Strelkov, S.V., 2011. Three-Dimensional Structure of alpha-Crystallin Domain Dimers of Human Small Heat Shock Proteins HSPB1 and HSPB6. *Journal of Molecular Biology* 411, 110-122.
9. Becila, S., Hernan Herrera-Mendez, C., Coulis, G., Labas, R., Astruc, T., Picard, B., Boudjellal, A., Pelissier, P., Bremaud, L., Ouali, A., 2010. Postmortem muscle cells die through apoptosis. *European Food Research and Technology* 231, 485-493.
10. BenHur, H., Thole, H.H., Mashiah, A., Insler, V., Berman, V., Shezen, E., Elias, D., Zuckerman, A., Ornoy, A., 1997. Estrogen, progesterone and testosterone receptors in human fetal cartilaginous tissue: Immunohistochemical studies. *Calcified Tissue International* 60, 520-526.
11. Bernard, C., Cassar-Malek, I., Le Cunff, M., Dubroeucq, H., Renand, G., Hocquette, J., 2007. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5229 - 5237.

12. Bjarnadottir, S.G., Hollung, K., Hoy, M., Bendixen, E., Codrea, M.C., Veiseth-Kent, E., 2012. Changes in protein abundance between tender and tough meat from bovine Longissimus thoracis muscle assessed by isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) and 2-dimensional gel electrophoresis analysis. *Journal of Animal Science* 90, 2035-2043.
13. Bouley, J., 2004. Analyse protéomique du muscle de Bovin appliquée à la recherche de marqueurs de la tendreté de la viande. *Rencontre Recherches Ruminants*, Paris, pp. 87-89.
14. Bouley, J., Chambon, C., Picard, B., 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 1811-1824.
15. Brady, J.P., Garland, D.L., Green, D.E., Tamm, E.R., Giblin, F.J., Wawrousek, E.F., 2001. alpha B-crystallin in lens development and muscle integrity: A gene knockout approach. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 42, 2924-2934.
16. Bratzler, L.J., 1958. Fifty years of progress in meat research. *Journal of animal science* 17, 1079-1087.
17. Brooke, M.H., Kaiser, K.K., 1970. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol* 23, 369-379.
18. Brown, D.D., Christine, K.S., Showell, C., Conlon, F.L., 2007. Small heat shock protein hsp27 is required for proper heart tube formation. *Genesis* 45, 667-678.
19. Bruey, J.M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S.A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A.P., Kroemer, G., Solary, E., Garrido, C., 2000. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2, 645-652.
20. Burel, C., Mezger, V., Pinto, M., Rallu, M., Trigon, S., Morange, M., 1992. Mammalian heat-shock protein families - expression and functions. *Experientia* 48, 629-634.
21. Capetanaki, Y., Bloch, R.J., Kouloumenta, A., Mavroidis, M., Psarras, S., 2007. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp. Cell Res.* 313, 2063-2076.
22. Cassar-Malek, I., 2012. phénotypage des muscles de bovin à laide des profils d'expression génique : Une stratégie pour comprendre l'élaboration de la qualité de la viande Habilitation à diriger les Recherches.

23. Cassar-Malek, I., Picard, B., Bernard, C., Hocquette, J.F., 2008. Application of gene expression studies in livestock production systems: a European perspective. *Aust. J. Exp. Agric.* 48, 701-710.
24. Chambaz, A., Scheeder, M.R.L., Kreuzer, M., Dufey, P.A., 2003. Meat quality of Angus, Simmental, Charolais and Limousin steers compared at the same intramuscular fat content. *Meat Science* 63, 491-500.
25. Chaze, T., Bouley, J., Chambon, C., Barboiron, C., Picard, B., 2006. Mapping of alkaline proteins in bovine skeletal muscle. *Proteomics* 6, 2571-2575.
26. Chaze, T., Hocquette, J.F., Meunier, B., Renan, G., Journaux, L., Capel, C., Picard, B., 2009a. Recherche de marqueurs de tendreté de la viande de jeunes bovins de races à viande par analyse protéomique. *Rencontres Recherches Ruminants*, Paris, pp. 151-154.
27. Chaze, T., Meunier, B., Chambon, C., Jurie, C., Picard, B., 2009b. Proteome dynamics during contractile and metabolic differentiation of bovine foetal muscle. *Animal* 3, 980-1000.
28. Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Capetanaki, Y., Cryns, V.L., 2003. Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis. *J Biol Chem* 278, 6848-6853.
29. Choi, Y.M., Lee, S.H., Choe, J.H., Rhee, M.S., Lee, S.K., Joo, S.T., Kim, B.C., 2010. Protein solubility is related to myosin isoforms, muscle fiber types, meat quality traits, and postmortem protein changes in porcine longissimus dorsi muscle. *Livestock Science* 127, 183-191.
30. Chriki, S., Picard, B., Jurie, C., Reichstadt, M., Micol, D., Brun, J.P., Journaux, L., Hocquette, J.F., 2012. Meta-analysis of the comparison of the metabolic and contractile characteristics of two bovine muscles: Longissimus thoracis and semitendinosus. *Meat Science* 91, 423-429.
31. Chriki, S., Renand, G., Picard, B., Micol, D., Journaux, L., Hocquette, J.F., 2013. Meta-analysis of the relationships between beef tenderness and muscle characteristics. *Livestock Science* submitted.
32. Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C., Gregorio, C.C., 2002. Striated muscle cytoarchitecture: An intricate web of form and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18, 637-706.

33. Coibion, L., 2008. Acquisitaion des qualités organoleptiques de la viande bovine : Adaptation à la demande du consommateur. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, p. 96.
34. Concannon, C.G., Gorman, A.M., Samalli, A., 2003. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8, 61-70.
35. Crouse, J.D., Koohmaraie, M., Seideman, S.D., 1991. The relationship of muscle-fibre size to tenderness of beef. *Meat Science* 30, 295-302.
36. Cuesta, R., Laroia, G., Schneider, R.J., 2000. Chaperone Hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes & Development* 14, 1460-1470.
37. Dahlmann, B., Ruppert, T., Kloetzel, P.M., Kuehn, L., 2001. Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. *Biochimie* 83, 295-299.
38. Dargelos, E., Poussard, S., Brule, C., Daury, L., Cottin, P., 2008. Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: A possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie* 90, 359-368.
39. Denoyelle, C., 2008. Les viandes, une question de définition... *Cahiers de nutrition et de diététique* 43, 1S7-1S10.
40. Didelot, C., Schmitt, E., Brunet, M., Maingret, L., Parcellier, A., Garrido, C., 2006. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handbook of experimental pharmacology*, 171-198.
41. Didomenico, B.J., Lupisella, J., Sandbaken, M., Chakraborty, K., 1992. Isolation and sequence-analysis of the gene encoding translation elongation factor-iii from *Candida albicans*. *Yeast* 8, 337-352.
42. Dix, D.J., Allen, J.W., Collins, B.W., Poorman-Allen, P., Mori, C., Blizard, D.R., Brown, P.R., Goulding, E.H., Strong, B.D., Eddy, E.M., 1997. HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* 124, 4595-4603.
43. Dransfield, E., Martin, J.F., Bauchart, D., Abouelkaram, S., Lepetit, J., Culioli, J., Jurie, C., Picard, B., 2003. Meat quality and composition of three muscles from French cull cows and young bulls. *Anim. Sci.* 76, 387-399.
44. Dransfield, E., Nute, G.R., Mottram, D.S., Rowan, T.G., Lawrence, T.L.J., 1985. Pork quality from pigs fed on low glucosinate rapeseed meal - influence of level in the diet, sex and ultimate pH. *J. Sci. Food Agric.* 36, 546-556.

45. During, R.L., Gibson, B.G., Li, W., Bishai, E.A., Sidhu, G.S., Landry, J., Southwick, F.S., 2007. Anthrax lethal toxin paralyzes actin-based motility by blocking Hsp27 phosphorylation. *Embo Journal* 26, 2240-2250.
46. Etherington, D.J., Sims, T.J., 1981. Detection and estimation of collagen. *J. Sci. Food Agric.* 32, 539-546.
47. Evrat-Georgel, C., 2008. Bibliographie critique des méthodes instrumentales et mesure de la tendreté de la viande bovine. Office d'élevage et Interbev.
48. Fan, C.Y., Lee, S., Cyr, D.M., 2003. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones* 8, 309-316.
49. Fan, J., Ren, H., Jia, N., Fei, E., Zhou, T., Jiang, P., Wu, M., Wang, G., 2008. DJ-1 Decreases Bax Expression through Repressing p53 Transcriptional Activity. *J. Biol. Chem.* 283, 4022-4030.
50. Fiorenza, M.T., Farkas, T., Dissing, M., Kolding, D., Zimarino, V., 1995. Complex expression of murine heat-shock transcription factors. *Nucleic Acids Research* 23, 467-474.
51. Flamion, N., 2012. Intégrer des critères de qualité de viande dans l'objectifs de sélection en bovins allaitants, qu'en pensent les acteurs de la filière? . Institut de l'élevage
52. Fontaine, J.M., Sun, X.K., Benndorf, R., Welsh, M.J., 2005. Interactions of HSP22 (HSPB8) with HSP20, alpha B-crystallin, and HSPB3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337, 1006-1011.
53. Gao, Y., Han, C., Huang, H., Xin, Y., Xu, Y., Luo, L., Yin, Z., 2010. Heat shock protein 70 together with its co-chaperone CHIP inhibits TNF-alpha induced apoptosis by promoting proteasomal degradation of apoptosis signal-regulating kinase1. *Apoptosis* 15, 822-833.
54. Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., Kroemer, G., 2006. Heat shock proteins 27 and 70. *Cell Cycle* 5, 2592-2601.
55. Garrido, C., Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A.P., Mehlen, P., Solary, E., 1998. Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Research* 58, 5495-5499.
56. Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., Kroemer, G., 2001. Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286, 433-442.

57. Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J.F., Culioli, J., 2001. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reproduction Nutrition Development* 41, 1-26. Erratum, 41, 377.
58. Gesualdi, N.M., Chirico, G., Pirozzi, G., Costantino, E., Landriscina, M., Esposito, F., 2007. Tumor necrosis factor-associated protein 1 (TRAP-1) protects cells from oxidative stress and apoptosis. *Stress-the International Journal on the Biology of Stress* 10, 342-350.
59. Gibert, B., 2010. La protéine de stress Hsp27 / HspB1, une cible de choix en thérapie anti-cancéreuse. Université Claude Bernard - Lyon I.
60. Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H.Q., Wei, W., Cong, J.Y., 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83, 731-801.
61. Gordon, A.M., Homsher, E., Regnier, M., 2000. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* 80, 853-924.
62. Got, F., Culioli, J., Berge, P., Vignon, X., Astruc, T., Quideau, J.M., Lethiecq, M., 1999. Effects of high-intensity high-frequency ultrasound on ageing rate, ultrastructure and some physico-chemical properties of beef. *Meat Science* 51, 35-42.
63. Gotoh, T., Terada, K., Mori, M., 2001. Hsp70-DnaJ chaperone pairs prevent nitric oxide-mediated apoptosis in RAW 264.7 macrophages. *Cell Death and Differentiation* 8, 357-366.
64. Guillemin, N., Bonnet, M., Jurie, C., Picard, B., 2011a. Functional analysis of beef tenderness. *J. Proteomics* 75, 352-365.
65. Guillemin, N., Cassar-Malek, I., Hocquette, J.F., Jurie, C., Micol, D., Listrat, A., Leveziel, H., Renand, G., Picard, B., 2009. La maîtrise de la tendreté de la viande bovine: identification de marqueurs biologiques. *INRA Productions Animales* 22, 331-344.
66. Guillemin, N., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J., Renand, G., Picard, B., 2011b. Variations in the abundance of 24 proteins biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal* 6, 867 - 874.
67. Guillemin, N.P., Jurie, C., Renand, G., Hocquette, J.F., Micol, D., Lepetit, J., Picard, B., 2012. Different phenotypic and proteomic markers explain variability of beef tenderness across muscles. *International Journal of Biology* 4, 26-38.

68. Guth, L., Samaha, F.J., 1969. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Experimental neurology* 25, 138-152.
69. Guth, L., Samaha, F.J., 1970. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Experimental Neurology* 28, 365 - 367.
70. Harper, G.S., 1999. Trends in skeletal muscle biology and the understanding of toughness in beef. *Aust. J. Agric. Res.* 50, 1105-1129.
71. Herrera-Mendez, C.H., Becila, S., Boudjellal, A., Ouali, A., 2006. Meat ageing: Reconsideration of the current concept. *Trends in Food Science & Technology* 17, 394-405.
72. Hocquette, J.F., Bernard-Capel, C., Vidal, V., Jesson, B., Leveziel, H., Renand, G., Cassar-Malek, I., 2012. The GENOTEND chip: a new tool to analyse gene expression in muscles of beef cattle for beef quality prediction. *Bmc Veterinary Research* 8.
73. Hocquette, J.F., Bernard, C., Cassar-Malek, I., Lepetit, J., Micol, D., Jurie, C., Meunier, B., Renand, G., Picard, B., 2007a. New indicators of beef tenderness revealed by functional genomic approaches (the MUGENE project). *Rencontres Recherches Ruminants*, 117-120.
74. Hocquette, J.F., Cassar-Malek, I., Listrat, A., Jurie, C., Jailler, R., Picard, B., 2005a. Evolution des recherches sur le muscle des bovins et la qualité sensorielle de leur viande I. Vers une meilleure connaissance de la biologie musculaire. *Cahiers Agricultures* 14, 283-289.
75. Hocquette, J.F., Cassar-Malek, I., Listrat, A., Picard, B., 2005b. Current genomics in cattle and application to beef quality. In: Hocquette, J.F., Gigli, S. (Eds.), *Indicators of milk and beef quality*. European Association for Animal Production, pp. 65-79.
76. Hocquette, J.F., Lehnert, S.A., Barendse, W., Cassar-Malek, I., Picard, B., 2007b. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal* 1, 159-173.
77. Hocquette, J.F., Renand, G., Leveziel, H., Picard, B., Cassar-Malek, I., 2006. The potential benefits of genetics and genomics to improve beef quality - a review. *Animal Science Papers and Reports* 24, 173-189.
78. Hopkins, D.L., Taylor, R.G., 2004. *Post-mortem muscle proteolysis and meat tenderness*. CABI Publishing.

79. Hu, S.I., Katz, M., Chin, S., Qi, X.Q., Cruz, J., Ibebunjo, C., Zhao, S.C., Chen, A., Glass, D.J., 2012. MNK2 Inhibits eIF4G Activation Through a Pathway Involving Serine-Arginine-Rich Protein Kinase in Skeletal Muscle. *Science Signaling* 5.
80. Huang, L., Min, J.N., Masters, S., Mivechi, N.F., Moskophidis, D., 2007. Insights into function and regulation of small heat shock protein 25 (HSPB1) in a mouse model with targeted gene disruption. *Genesis* 45, 487-501.
81. Huff-Loneragan, E., Lonergan, S.M., 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science* 71, 194-204.
82. Huff-Loneragan, E.J., Lonergan, S.M., 1999. Postmortem mechanisms of meat tenderization: The roles of the structural proteins and the calpain system. In: Y.L. Xiong, C.T.H.a.F.S. (Ed.), *Quality Attributes of Muscle Foods*. Kluwer Academic/Plenum Press, New-York, pp. 229-252.
83. Hunt, C., Morimoto, R.I., 1985. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide-sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 6455-6459.
84. Huot, J., Houle, F., Marceau, F., Landry, J., 1997. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ.Res.* 80, 383-392.
85. Hwang, I.H., Park, B.Y., Kim, J.H., Cho, S.H., Lee, J.M., 2005. Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus. *Meat Science* 69, 79-91.
86. Ito, H., Kamei, K., Iwamoto, I., Inaguma, Y., Kato, K., 2001. Regulation of the levels of small heat-shock proteins during differentiation of C2C12 cells. *Exp. Cell Res.* 266, 213-221.
87. Jia, X., Ekman, M., Grove, H., Faergestad, E., Aass, L., Hildrum, K., Hollung, K., 2007. Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early post-mortem storage period. *J Proteome Res* 6, 2720 - 2731.
88. Jia, X., Hollung, K., Therkildsen, M., Hildrum, K.I., Bendixen, E., 2006. Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. longissimus dorsi and M. semitendinosus. *Proteomics* 6, 936-944.
89. Johnston, D.J., Reverter, A., Ferguson, D.M., Thompson, J.M., Burrow, H.M., 2003. Genetic and phenotypic characterisation of animal, carcass, and meat quality traits

- from temperate and tropically adapted beef breeds. 3. Meat quality traits. *Aust. J. Agric. Res.* 54, 135-147.
90. Jurie, C., Listrat, A., 2010. Structure et fonction des constituants du muscle squelettique. In: Picard, B., Bauchart, D. (Eds.), *Muscle et viande de ruminant*, pp. 61-70.
 91. Jurie, C., Picard, B., Hocquette, J.F., Dransfield, E., Micol, D., Listrat, A., 2007. Muscle and meat quality characteristics of Holstein and Salers cull cows. *Meat Science* 77, 459-466.
 92. Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., Hightower, L.E., 2009. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14, 105-111.
 93. Kamradt, M.C., Chen, F., Sam, S., Cryns, V.L., 2002. The small heat shock protein alpha B-crystallin negatively regulates apoptosis during myogenic differentiation by inhibiting caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* 277, 38731-38736.
 94. Kappe, G., Leunissen, J.A.M., de Jong, W.W., 2002. Evolution and diversity of prokaryotic small heat shock proteins. *Progress in molecular and subcellular biology* 28, 1-17.
 95. Kato, K., Adachi, S., Matsushima-Nishiwaki, R., Minamitani, C., Natsume, H., Katagiri, Y., Hirose, Y., Mizutani, J., Tokuda, H., Kozawa, O., Otsuka, T., 2011. Regulation by Heat Shock Protein 27 of Osteocalcin Synthesis in Osteoblasts. *Endocrinology* 152, 1872-1882.
 96. Kayalar, C., Ord, T., Testa, M.P., Zhong, L.T., Bredesen, D.E., 1996. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2234-2238.
 97. Kemp, C., Sensky, P., Bardsley, R., Buttery, P., Parr, T., 2010. Tenderness - An enzymatic view. *Meat Sci* 84, 248 - 256.
 98. Kemp, C.M., Parr, T., 2012. Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation. *Meat Science* 92, 252-259.
 99. Kim, N., Cho, S., Lee, S., Park, H., Lee, C., Cho, Y., Choy, Y., Yoon, D., Im, S., Park, E., 2008. Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Science* 80, 1068-1073.

100. Koizumi, S., Suzuki, K., Yamaguchi, S., 2013. Heavy metal response of the heat shock protein 70 gene is mediated by duplicated heat shock elements and heat shock factor 1. *Gene* 522, 184-191.
101. Koohmaraie, M., Geesink, G.H., 2006. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science* 74, 34-43.
102. Koohmaraie, M., Whipple, G., Kretchmar, D.H., Crouse, J.D., Mersmann, H.J., 1991. Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J Anim Sci* 69, 617-624.
103. Kudo, T., Imaizumi, K., Hara, H., 2007. A molecular chaperone inducer as potential therapeutic agent for neurodegenerative disease. *Nihon shinkei seishin yakurigaku zasshi = Japanese journal of psychopharmacology* 27, 63-67.
104. Kwasiborski, A., Sayd, T., Chambon, C., Sante-Lhoutellier, V., Rocha, D., Terlouw, C., 2008. Pig Longissimus lumborum proteome: Part II: Relationships between protein content and meat quality. *Meat Science* 80, 982-996.
105. Lanneau, D., de Thonel, A., Maurel, S., Didelot, C., Garrido, C., 2007. Apoptosis Versus Cell Differentiation Role of Heat Shock Proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion* 1, 53-60.
106. Laville, E., Sayd, T., Morzel, M., Blinet, S., Chambon, C., Lepetit, J., Renand, G., Hocquette, J.F., 2009. Proteome Changes during Meat Aging in Tough and Tender Beef Suggest the Importance of Apoptosis and Protein Solubility for Beef Aging and Tenderization. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10755-10764.
107. Leberer, E., Timms, B.G., Campbell, K.P., MacLennan, D.H., 1990. Purification, calcium-binding properties, and ultrastructural-localization of the 53,000-dalton and 160,000 (sarcalumenin)-dalton glycoproteins of the sarcoplasmic-reticulum. *J. Biol. Chem.* 265, 10118-10124.
108. Lepetit, J., Culioli, J., 1994. Mechanical properties of meat. *Meat Sci.* 36, 203-237.
109. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, S., Darnell, J., 2004. *Molecular cell biology*
110. Lomiwes, D., Farouk, M.M., Frost, D.A., Dobbie, P.M., Young, O.A., 2012. Small heat shock proteins and toughness in intermediate pHu beef. *Meat science*.

111. Lomiwes, D., Farouk, M.M., Wiklund, E., Young, O.A., 2013. Small heat shock proteins and their role in meat tenderness. *Meat science*.
112. Lorenzen, C.L., Miller, R.K., Taylor, J.F., Neely, T.R., Tatum, J.D., Wise, J.W., Buyck, M.J., Reagan, J.O., Savell, J.W., 2003. Beef customer satisfaction: Trained sensory panel ratings and Warner-Bratzler shear force values. *Journal of Animal Science* 81, 143-149.
113. Maddock, K.R., Huff-Lonergan, E., Rowe, L.J., Lonergan, S.M., 2005. Effect of pH and ionic strength on mu- and m-calpain inhibition by calpastatin. *Journal of Animal Science* 83, 1370-1376.
114. Makareeva, E., Leikin, S., 2007. Procollagen Triple Helix Assembly: An Unconventional Chaperone-Assisted Folding Paradigm. *Plos One* 2.
115. Maki, R.G., Old, L.J., Srivastava, P.K., 1990. Human homolog of murine tumor rejection antigen gp96 - 5'-regulatory and coding regions and relationship to stress-induced proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5658-5662.
116. Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R., Delday, M., 2003. Determinants of meat quality: tenderness. *Proc Nutr Soc* 62, 337-347.
117. Marshall, D.M., 1999. *Genetics of meat quality*. CABI Publishing.
118. Mashima, T., Naito, M., Fujita, N., Noguchi, K., Tsuruo, T., 1995. Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 217, 1185-1192.
119. McArdle, A., Broome, C.S., Kayani, A.C., Tully, M.D., Close, G.L., Vasilaki, A., Jackson, M.J., 2006. HSF expression in skeletal muscle during myogenesis: Implications for failed regeneration in old mice. *Experimental Gerontology* 41, 497-500.
120. McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J., Bukau, B., 1995. The role of aip in the functional cycle of the dnak chaperone system. *Journal of Molecular Biology* 249, 126-137.
121. McMillan, D.R., Xiao, X.Z., Shao, L., Graves, K., Benjamin, I.J., 1998. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 7523-7528.

122. Mehlen, P., SchulzeOsthoff, K., Arrigo, A.P., 1996. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis - Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 271, 16510-16514.
123. Meunier, B., Picard, B., Astruc, T., Labas, R., 2010. Development of image analysis tool for the classification of muscle fibre type using immunohistochemical staining. *Histochem. Cell Biol.* 134, 307-317.
124. Middleton, R.C., Shelden, E.A., 2013. Small heat shock protein HSPB1 regulates growth of embryonic zebrafish craniofacial muscles. *Exp. Cell Res.* 319, 860-874.
125. Morrison, L.E., Whittaker, R.J., Klepper, R.E., Wawrousek, E.F., Glembotski, C.C., 2004. Roles for alpha B-crystallin and HSPB2 in protecting the myocardium from ischemia-reperfusion-induced damage in a KO mouse model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 286, H847-H855.
126. Morzel, M., Gatellier, P., Sayd, T., Renerre, M., Laville, E., 2006. Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. *Meat Science* 73, 536-543.
127. Morzel, M., Terlouw, C., Chambon, C., Micol, D., Picard, B., 2008. Muscle proteome and meat eating qualities of Longissimus thoracis of "Blonde d'Aquitaine" young bulls: A central role of HSP27 isoforms. *Meat Science* 78, 297-304.
128. Mosser, D.D., Morimoto, R.I., 2004. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23, 2907-2918.
129. Mounier, N., Arrigo, A.P., 2002. Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones* 7, 167-176.
130. Nakanishi, K., Maruyama, M., Shibata, T., Morishima, N., 2001. Identification of a caspase-9 substrate and detection of its cleavage in programmed cell death during mouse development. *J Biol Chem* 276, 41237-41244.
131. Nguyen, V.T., Morange, M., Bensaude, O., 1989. Protein denaturation during heat-shock and related stress - escherichia-coli beta-galactosidase and photinus-pyralis luciferase inactivation in mouse cells. *j. biol. chem.* 264, 10487-10492.
132. Olson, S.T., Gettins, P.G.W., 2011. Regulation of Proteases by Protein Inhibitors of the Serpin Superfamily. In: DiCera, E. (Ed.), *Proteases in Health and Disease*, pp. 185-240.

133. Ouali, A., 1991. Conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande. *Productions Animales* 4, 195-208.
134. Ouali, A., 1992. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie* 74, 251-265.
135. Ouali, A., Gagaoua, M., Boudida, Y., Becila, S., Abdelghani, B., Sentendreu, M.A., 2013. Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms *Meat Sci* Submitted
136. Ouali, A., Herrera-Mendez, C., Coulis, G., Becila, S., Boudjellal, A., Aubry, L., Sentandreu, M., 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Sci* 74, 44 - 58.
137. Ouali, A., Herrera-Mendez, C.H., Coulis, G., Samira, B., Boudjellal, A., Harhoura, K., Aubry, L., Sentandreu, M.A., 2007. Meat tenderisation and muscle cell death, two highly related events. *Tehnologija Mesa* 48, 1-15.
138. Ouali, A., Talmant, A., 1990. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science* 28, 331-348.
139. Oury, M.P., Picard, B., Briand, M., Blanquet, J.P., Dumont, R., 2009. Interrelationships between meat quality traits, texture measurements and physicochemical characteristics of *M. rectus abdominis* from Charolais heifers. *Meat Science* 83, 293-301.
140. Page, J.K., Wulf, D.M., Schwotzer, T.R., 2001. A survey of beef muscle color and pH. *J Anim Sci* 79, 678-687.
141. Paulsen, G., Lauritzen, F., Bayer, M.L., Kalhovde, J.M., Ugelstad, I., Owe, S.G., Hallen, J., Bergersen, L.H., Raastad, T., 2009. Subcellular movement and expression of HSP27, alpha beta-crystallin, and HSP70 after two bouts of eccentric exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 107, 570-582.
142. Péré Brissaud, A., 2012. Rôle(s) biologique(s) des anti-protéases bovSERPINA3s : Expression, localisation tissulaire et protéase(s) cible(s) de bovSERPINA3-7. Université de Limoges, p. 143.
143. Peters, J.-M., 1994. Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends in Biochemical Sciences* 19, 377-382.
144. Picard, B., 2012. Relationship between muscle fibers, growth efficiency and beef quality. In proceedings of the 8th SIMCORTE, Viçosa, Minas Gerais (Brasil).

145. Picard, B., Berri, C., Lebert, B., Lefevre, F., Liaubet, L., Damon, M., Le Bihan-Duval, E., Cassar-Malek, I., Hocquette, J.-F., Renand, G., 2012. Génomique et viande : quelles avancées, quelles applications ? Viandes et Produits Carnés hors séries.
146. Picard, B., Berri, C., Lefaucheur, L., Molette, C., Sayd, T., Terlouw, C., 2010. Skeletal muscle proteomics in livestock production. Briefings in Functional Genomics 9, 259-278.
147. Picard, B., Chaze, T., Meunier, B., Renand, G., Journaux, L., Capel, C., Hocquette, J., 2011. Proceedings of the BIT's 2nd World DNA and Genome Day, Dalian, Chine.
148. Picard, B., Duris, M.P., Jurie, C., 1998. Classification of bovine muscle fibres by different histochemical techniques. Histochem.J. 30, 473-479.
149. Picard, B., Jurie, C., Bauchart, D., Dransfield, E., Ouali, A., Martin, J.F., Jailler, R., Lepetit, J., Culioli, J., 2007. Caractéristiques des muscles et de la viande des principales races bovines allaitantes du Massif Central. Sci. Aliments 27/2, 168-180.
150. Picard, B., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J.F., Lefaucheur, I., Berri, C., Alami-Durante, H., Rescan, P.Y., 2003. Typologie et ontogénèse des fibres musculaires chez différentes espèces d'intérêt agronomique. Productions Animales 16, 117-123.
151. Pirkkala, L., Alastalo, T.P., Zuo, X.X., Benjamin, I.J., Sistonen, L., 2000. Disruption of heat shock factor 1 reveals an essential role in the ubiquitin proteolytic pathway. Molecular and Cellular Biology 20, 2670-2675.
152. Polati, R., Menini, M., Robotti, E., Million, R., Marengo, E., Novelli, E., Balzan, S., Cecconi, D., 2012. Proteomic changes involved in tenderization of bovine Longissimus dorsi muscle during prolonged ageing. Food Chemistry 135, 2052-2069.
153. Prodromou, C., Panaretou, B., Chohan, S., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Roe, S.M., Piper, P.W., Pearl, L.H., 2000. The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. Embo Journal 19, 4383-4392.
154. Pulford, D., Fraga Vazquez, S., Frost, D., Fraser-Smith, E., Dobbie, P., Rosenvold, K., 2008. The intracellular distribution of small heat shock proteins in post-mortem beef is determined by ultimate pH. Meat Sci 79, 623 - 630.

155. Renand, G., Picard, B., Touraille, C., Berge, P., Lepetit, J., 2001. Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Science* 59, 49-60.
156. Renand, G., Touraille, C., Geay, Y., Berge, P., Lepetit, J., Picard, B., 1997. Variabilité des qualités organoleptiques de la viande bovine en relation avec les caractéristiques musculaires. 4ème Rencontres autour des recherches sur les ruminants. Institut de l'élevage, Paris (FRA), pp. 311-314.
157. Rhee, M.S., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., 2004. Variation in palatability and biochemical traits within and among eleven beef muscles. *Journal of Animal Science* 82, 534-550.
158. Robert, J., Menoret, A., Cohen, N., 1999. Cell surface expression of the endoplasmic reticular heat shock protein gp96 is phylogenetically conserved. *Journal of Immunology* 163, 4133-4139.
159. Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Ducasse, C., Paul, C., Wieske, M., Arrigo, A.P., Buchner, J., Gaestel, M., 1999. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274, 18947-18956.
160. Samali, A., Robertson, J.D., Peterson, E., Manero, F., van Zeijl, L., Paul, C., Cotgreave, I.A., Arrigo, A.P., Orrenius, S., 2001. Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress Chaperones* 6, 49-58.
161. Sayd, T., Morzel, M., Chambon, C., Franck, M., Figwer, P., Larzul, C., Le Roy, P., Monin, G., Cherel, P., Laville, E., 2006. Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig Semimembranosus muscle: Implications on meat color development. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2732-2737.
162. Schiaffino, S., Reggiani, C., 2011. fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* 91, 1447-1531.
163. Schreurs, N.M., Garcia, F., Jurie, C., Agabriel, J., Micol, D., Bauchart, D., Listrat, A., Picard, B., 2008. Meta-analysis of the effect of animal maturity on muscle characteristics in different muscles, breeds, and sexes of cattle. *Journal of Animal Science* 86, 2872-2887.

164. Sentandreu, M.A., Coulis, G., Ouali, A., 2002. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science & Technology* 13, 400-421.
165. Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Whipple, G., Wheeler, T.L., Miller, M.F., Crouse, J.D., Reagan, J.O., 1991. Predictors of beef tenderness - Development and verification. *Journal of Food Science* 56, 1130-1135.
166. Silva, J.A., Patarata, L., Martins, C., 1999. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. *Meat Science* 52, 453-459.
167. Simioni, M.B., De Thonel, A., Hammann, A., Joly, A.L., Bossis, G., Fourmaux, E., Bouchot, A., Landry, J., Piechaczyk, M., Garrido, C., 2009. Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity. *Oncogene* 28, 3332-3344.
168. Stope, M.B., Schubert, T., Staar, D., Ronnau, C., Streitborger, A., Kroeger, N., Kubisch, C., Zimmermann, U., Walther, R., Burchardt, M., 2012. Effect of the heat shock protein HSP27 on androgen receptor expression and function in prostate cancer cells. *World Journal of Urology* 30, 327-331.
169. Strydom, P.E., Naude, R.T., Smith, M.F., Scholtz, M.M., van Wyk, J.B., 2000. Characterisation of indigenous African cattle breeds in relation to meat quality traits. *Meat Science* 55, 79-88.
170. Tang, J.L., Faustman, C., Hoagland, T.A., Mancini, R.A., Seyfert, M., Hunt, M.C., 2005. Postmortem oxygen consumption by mitochondria and its effects on myoglobin form and stability. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1223-1230.
171. Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 231-241.
172. Taylor, R.G., Geesink, G.H., Thompson, V.F., Koohmaraie, M., Goll, D.E., 1995. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *J Anim Sci* 73, 1351-1367.
173. Taylor, R.P., Benjamin, I.J., 2005. Small heat shock proteins: a new classification scheme in mammals. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38, 433-444.
174. Therkildsen, M., Larsen, L.M., Bang, H.G., Vestergaard, M., 2002. Effect of growth rate on tenderness development and final tenderness of meat from Friesian calves. *Anim. Sci.* 74, 253-264.

175. Thomas, A.R., Gondoza, H., Hoffman, L.C., Oosthuizen, V., Naude, R.J., 2004. The roles of the proteasome, and cathepsins B, L, H and D, in ostrich meat tenderisation. *Meat Science* 67, 113-120.
176. Valin, C., 1988. Muscle differentiation - technological consequences for the meat industry. *Reproduction Nutrition Development* 28, 845-856.
177. Vidyasagar, A., Wilson, N.A., Djamali, A., 2012. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis & tissue repair* 5, 7.
178. Vlahopoulos, S., Zimmer, W.E., Jenster, G., Belaguli, N.S., Balk, S.P., Brinkmann, A.O., Lanz, R.B., Zoumpourlis, V.C., Schwartz, R.J., 2005. Recruitment of the Androgen Receptor via Serum Response Factor Facilitates Expression of a Myogenic Gene. *J. Biol. Chem.* 280, 7786-7792.
179. Wettstein, G., Bellaye, P.S., Micheau, O., Bonniaud, P., 2012. Small heat shock proteins and the cytoskeleton: An essential interplay for cell integrity? *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44, 1680-1686.
180. Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Johnson, I.P., Miller, M.F., Miller, R.K., Koohmaraie, M., 1997. A comparison of Warner-Bratzler shear force assessment within and among institutions. *Journal of Animal Science* 75, 2423-2432.
181. Whipple, G., Koohmaraie, M., Dikeman, M.E., Crouse, J.D., Hunt, M.C., Klemm, R.D., 1990. Evaluation of attributes that affect *longissimus* muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.* 68, 2716-2728.
182. Whitesell, L., Lindquist, S.L., 2005. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature Reviews Cancer* 5, 761-772.
183. Xia, Y., Rocchi, P., Iovanna, J.L., Peng, L., 2012. Targeting heat shock response pathways to treat pancreatic cancer. *Drug Discovery Today* 17, 35-43.
184. Yang, Y., Li, Z.H., 2005. Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: Redundant or unique function? *Molecules and Cells* 20, 173-182.
185. Zamora, F., Debiton, E., Lepetit, J., Lebert, A., Dransfield, E., Ouali, A., 1996. Predicting variability of ageing and toughness in beef M. Longissimus lumborum et thoracis. *Meat Science* 43, 321-333.
186. Zeece, M.G., Katoh, K., 1989. cathepsin d and its effects on myofibrillar proteins: a review1. *journal of food biochemistry* 13, 157-178.

187. Zhao, C., Tian, F., Yu, Y., Luo, J., Hu, Q., Bequette, B., Baldwin Vi, R., Liu, G., Zan, L., Scott Updike, M., Song, J., 2012. Muscle transcriptomic analyses in Angus cattle with divergent tenderness. *Mol Biol Rep* 39, 4185 - 4193.
188. Zoubeidi, A., Zardan, A., Beraldi, E., Fazli, L., Sowery, R., Rennie, P., Nelson, C., Gleave, M., 2007. Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity. *Cancer Research* 67, 10455-10465.

Résumés

La recherche des marqueurs biologiques de la tendreté a fait l'objet de nombreux travaux chez les animaux producteurs de viande et en particulier les bovins. A l'issue de ces études, une expression différentielle de la protéine Hsp27 entre des groupes de tendreté extrême a été mise en évidence. Cette protéine est présente à un « carrefour » biologique de l'interactome lié à la tendreté. Comprendre les mécanismes d'action de la protéine Hsp27 dans la tendreté de la viande bovine est l'un des défis de recherche dans le domaine de la production de viande. Dans cette optique, mon travail de thèse (2010-2013) avait pour objectif d'analyser le rôle de Hsp27 dans le développement du muscle et son implication dans le déterminisme des caractéristiques des tissus liés à la qualité de la viande.

La première étape de ce travail a consisté à produire un modèle de souris présentant une inactivation du gène de la protéine Hsp27 (KO HspB1) et d'analyser leur phénotype comparativement à des témoins. Les souris KO HspB1 sont viables, fertiles et ne présentent aucune anomalie majeure, mais ont un format plus petit que celui de leurs témoins. L'analyse de leurs caractéristiques musculaires par une technique immunohistologique mise au point spécifiquement (*Publication 1*) n'a pas révélé de différences. Au niveau ultrastructural, l'observation du muscle des souris par microscopie électronique à transmission a révélé des différences ultrastructurales entre les deux génotypes à T0 *post-mortem* avec des écarts entre les myofibrilles très espacées chez les souris KO HspB1 et un appareil contractile musculaire moins organisé. Ces différences sont encore plus marquées à T72 heures *post-mortem*. Ainsi le phénotype musculaire fin des souris KO HspB1 est plus altéré (*Publication 2*).

Une analyse bio-informatique a été réalisée dans l'objectif de compléter la liste des interacteurs de la protéine Hsp27 et des gènes cibles de l'invalidation d'HspB1 susceptibles de participer à des différences de structure du muscle et de la tendreté. Les partenaires ou cibles prédits de Hsp27 sont des protéines impliquées dans différentes fonctions, comme des Heat shock protéines, des régulateurs de l'apoptose, des facteurs de traduction, des protéines du cytosquelette et des antioxydants. Les abondances de 15 protéines ont été quantifiées par Western-blotting dans deux muscles (m. *Soleus*, m. *Tibialis*). Elles sont modifiées chez les souris dépourvues de Hsp27 principalement dans le muscle le plus oxydatif. Cette étude démontre l'existence de liens fonctionnels entre Hsp27 et ses cibles prédites qui pourraient participer au phénotype fin des souris (*Publication 3*).

Pour compléter cette étude, une analyse protéomique du muscle *Tibialis anterior* a été menée en utilisant la technique d'électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse. La comparaison des protéomes spécifiques de ces deux génotypes a permis de mettre en évidence des profils d'expression différents pour plusieurs protéines. Elle confirme l'effet muscle spécifique du KO et révèle un lien avec le métabolisme du calcium et des Hsps différentes de celles mises en évidence dans le muscle oxydatif (*Publication 4*).

L'ensemble des données issues de cette étude réalisée dans une espèce modèle apporte des connaissances nouvelles susceptibles d'éclairer sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement de la tendreté de la viande bovine. Elle suggère que le statut en Hsp, les processus apoptotiques et la protection contre le stress oxydatif contribuent à l'évolution de l'ultrastructure *post-mortem* des muscles et à la tendreté de la viande. Ces nouvelles connaissances seront validées ultérieurement sur muscle bovin.

Thanks to genomics, we have previously identified markers of beef tenderness, and computed a bioinformatic analysis that enabled us to build an interactome in which we found Hsp27 at a crucial node. Understanding the role of Hsp27 in the development of muscle and in the determinism of beef tenderness is one of the research challenges in meat production. In this context, my PhDthesis (2010-2013) aimed to analyze the role of Hsp27 in muscle development and its involvement in the determination of the characteristics related to the quality of the meat tissue.

In this study, we generated mice devoid of Hsp27 protein by homologous recombination of the HspB1 gene as an animal model. The HspB1^{-/-} mice were viable and fertile, showing no apparent abnormality but a smaller than their control format. The muscle structure of animals was examined by optical microscopy and transmission electron microscopy. The first approach, made by a developed immunohistochemical classification (Publication 1), did not reveal any differences in the characteristics of muscle fibers (contractile and metabolic type, shape, perimeter, cross-sectional area) but a trend for a higher proportion of small fibers. Different myosin heavy chains electrophoretic profiles were also observed in HspB1^{-/-} mice. At the ultrastructural level, examination of the myofibrillar material showed destructured myofibrils and higher gaps between myofibrils in HspB1^{-/-}, and a greater disintegration of myofibrils at 72h *postmortem* (Publication 2).

We have used a network-based approach for understanding the contribution of Hsp27 to tenderness through the prediction of its interactors related to tenderness. We have revealed the direct interactors of Hsp27. The predicted partners of Hsp27 included proteins involved in different functions e.g. members of Hsp families, regulators of apoptosis, translation factors, cytoskeletal proteins and antioxidants. The abundances of 15 proteins were quantified by Western blotting in two muscles of HspB1-null mice and their controls. We observed changes in the amount of most of the Hsp27 predicted targets in mice devoid of Hsp27 mainly in the most oxidative muscle (Soleus). Our study demonstrates the functional links between Hsp27 and its predicted targets. It suggests that Hsp status, apoptotic processes and protection against oxidative stress are crucial for *post-mortem* muscle metabolism, subsequent proteolysis, and therefore for beef tenderness (Publication 3).

To complete this study, we performed a proteomic analysis of m. *Tibialis anterior* (glycolytic muscle), using 2D gel electrophoresis, to detect changes in protein abundance subsequent to the invalidation of HspB1 gene. This study confirms the muscle specific effect of HspB1 invalidation and reveals a new list of Heat shock proteins different from those highlighted in oxidative muscle and relationships with calcium (Publication 4).

All together, these results provided from a model species showed the very important role of Hsp27 for muscle ultrastructure and revealed its implication in different muscle biological pathways. This provided new elements for understanding the crucial role for Hsp27 in the modulation of the tenderizing process of muscle during meat ageing that will be further examined in beef.

Key words: Hsp27, Muscle, HspB1-null mice, Ultrastructure, interactors, Tenderness.